

Patientenindividualisierte Therapie unter Berücksichtigung
verschiedener Aspekte – von der Patientenschulung bis zur
Verwendung von molekularen Biomarkern

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte Dissertation

von Manar Abu Abed

aus Marburg

1. Referent: Professor Dr. Ingo Rustenbeck

2. Referent: Professor Dr. med. Jürgen Brockmüller

Eingereicht am: 9.10.2013

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 11.12.2013

Druckjahr 2014

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

T.D. Hua, S.V. Vormfelde, M. Abu Abed, H. Schneider-Rudt, P. Sobotta, T. Friede, J.F. Chenot. Practice nursed-based, individual and video-assisted patient education in oral anticoagulation - protocol of a cluster-randomized controlled trial. *BMC Family Practice* 10, 2011

T. D. Hua, S.V. Vormfelde, M. Abu Abed, H. Schneider-Rudt, P. Sobotta, J.F. Chenot. Orale Antikoagulation in der Hausarztpraxis. *Zeitschrift für Allgemeinmedizin* 10, 2010

M. Abu Abed, T.D. Hua, J.F. Chenot, S.V. Vormfelde. Orale Antikoagulantien. *Deutsche Apotheker Zeitung* 32, 2010

Tagungsbeiträge

VKliPha, 14. Jahreskongress Klinische Pharmakologie, 2012, Effects of a complex education program for patients with oral anticoagulation treatment – a cluster randomized trial (Poster)

GTT, Göttinger Transportertage, 2012, Venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine as substrates of the Organic Cation Transporter OCT 1 (Vortrag)

DEGAM, 47. Kongress für Allgemeinmedizin und Familienmedizin, 2012, Effects of a complex education program for patients with oral anticoagulation treatment – a cluster randomized trial (Vortrag)

VKliPha, 13. Jahreskongress Klinische Pharmakologie, 2011, 1. Venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine as substrates of the organic cation transporter OCT1 (Poster), 2. Interacting drugs and food in oral anticoagulation – what patients know (Poster)

Für
meine Familie

لعائلي

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
------------------------------------	-----------

TABELLENVERZEICHNIS	12
----------------------------------	-----------

DANKSAGUNG.....	14
------------------------	-----------

PROJEKT I EFFEKTIVITÄT EINER KOMPLEXEN SCHULUNG BEI ANTIKOAGULIERTEN PATIENTEN	15
---	-----------

1. EINLEITUNG.....	16
---------------------------	-----------

1.1 Orale Antikoagulation.....	16
1.1.1 Wirkstoffe.....	16
1.1.2 Indikation.....	16
1.1.3 Pharmakodynamik.....	16
1.1.4 Pharmakokinetik.....	17
1.1.5 Verordnungshäufigkeiten	18
1.1.6 Herausforderung der oralen Antikoagulation	19
1.2 Patientenschulung	22
1.2.1 Patientenschulung allgemein	22
1.2.2 Video-unterstützte Patientenschulung	25
1.2.3 Patientenschulung bei oralen Antikoagulantien	26
1.3 Ziel der Studie	26
1.3.1 Ethik.....	26
1.3.2 Förderung.....	27

2. METHODIK.....	27
-------------------------	-----------

2.1 Rekrutierungsprozess/Teilnehmer.....	27
2.2 Studiendesign	27
2.3 Intervention	28
2.3.1 Video.....	28
2.3.2 Rekapitulation mit der medizinischen Fachangestellten	29
2.3.3 Broschüre.....	29
2.4 Kontrollgruppe	29
2.5 Studienendpunkte.....	30
2.6 Messinstrumente und Messzeitpunkte	30
2.6.1 Baseline.....	30
2.6.2 Zwischenerhebung.....	30
2.6.3 Abschluss.....	31
2.6.4 Zeit im therapeutischen Bereich	31
2.6.5 Komplikationen	31

2.7	Statistische Auswertung	31
2.7.1	Demographische Daten	32
2.7.2	Wissensfragen	32
2.7.2.1	Gesamtscore	32
2.7.3	Subjektives Sicherheitsempfinden	33
2.7.4	Zeit im therapeutischen Bereich	33
3.	ERGEBNISSE	34
3.1	Verwendete Wissensfragen	34
3.2	Rekrutierungsverlauf	39
3.3	Ergebnisse für Patienten	40
3.3.1	Soziodemographische Daten	40
3.3.2	Wissensfragen	43
3.3.3	Subjektives Sicherheitsempfinden zwischen Fragebogen Baseline und Abschluss	49
3.3.4	Zeit im therapeutischen Bereich	52
3.3.5	Auftreten von Komplikationen	53
3.3.6	Abschließende Bewertungsfragen im Abschlussfragebogen	54
3.3.7	Aus allen Wissensfragen ermittelter Gesamtscore	56
3.3.8	Regressionsanalysen	57
3.4	Angehörige	61
3.4.1	Soziodemographische Daten	61
3.4.2	Gesamtscore	62
4.	DISKUSSION	65
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	65
4.2	Stärken der Studie	66
4.3	Schwächen der Studie	66
4.4	Ausblick	67
4.4.1	Neue orale Antikoagulantien	67
4.4.2	Übertragbarkeit der Schulung	68
4.5	Vorschläge zur Verbesserung der Schulung	69
4.6	Schlussfolgerung	69
	ANHANG	71
PROJEKT II VENLAFAXIN UND O-DESMETHYLVENLAFAXIN ALS SUBSTRATE DER ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTER OCT1 UND OCT2		
83		
1.	EINLEITUNG	84
1.1	Die Krankheit Depression	84

1.2	Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin.....	85
1.2.1	Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin als Kandidaten für die OCTs	86
1.3	Organische Kationentransporter.....	87
1.3.1	Struktur und Gewebe-Lokalisation.....	88
1.3.2	Substrat- und Inhibitorspezifität der OCTs.....	90
1.3.3	Genetische Variationen in der SLC22A-Famile.....	91
1.4	Ziel der Arbeit.....	92
2.	MATERIAL UND METHODEN	93
2.1	Material	94
2.1.1	Reagenzien.....	94
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	97
2.1.3	Geräte.....	98
2.1.4	Software.....	99
2.1.5	Plasmidvektoren	100
2.1.6	Zelllinien.....	100
2.1.7	Bakterienstämme	100
2.2	Methoden.....	100
2.2.1	DNA.....	100
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR)...	100
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	101
2.2.1.3	Quantifizierung	102
2.2.1.4	DNA-Isolation.....	103
2.2.1.4.1	Isolation von genomischer DNA aus Zellen	103
2.2.1.4.2	DNA-Extraktion aus Agarose-Gel	103
2.2.1.4.3	Enzymatische Aufreinigung von genomischer DNA.....	103
2.2.1.5	Restriktionsverdau	104
2.2.1.5.1	Analytischer Restriktionsverdau	104
2.2.1.5.2	Präoperativer Restriktionsverdau	105
2.2.1.6	Ligation	105
2.2.1.7	Gezielte Mutagenese	106
2.2.1.8	PCR für chromosomale Integration	108
2.2.1.9	DNA-Sequenzierung	110
2.2.2	RNA.....	112
2.2.2.1	RNA-Isolation.....	112
2.2.2.2	RT-PCR (Real-time-PCR)	112
2.2.2.3	Real-time-quantitative-PCR.....	113
2.2.3	Protein-Analyse	115
2.2.3.1	Proteinquantifizierung.....	115
2.2.4	Bakterienkulturen	116

2.2.4.1	Medium und Wachstumsbedingungen.....	116
2.2.4.2	Lagerung von Bakterienstämmen	117
2.2.4.3	Elektroporation.....	117
2.2.4.4	Plasmidpräparation.....	118
2.2.4.4.1	Mini-Präparation	118
2.2.4.4.2	Midi-Präparation	119
2.2.5	Zellkultur	120
2.2.5.1	Verwendete Zellen und Kultivierungsbedingungen	120
2.2.5.2	Lichtmikroskopische Dokumentation	120
2.2.5.3	Zellzahl bestimmen	120
2.2.5.4	Zellen ausplattieren	121
2.2.5.5	Zellen einfrieren	121
2.2.5.6	Zellen auftauen.....	121
2.2.5.7	Stabile Transfektion mittels Flp recombinase.....	122
2.2.6	OCT1- und OCT2-Aktivitätsmessungen	125
2.2.6.1	ASP ⁺ -Aufnahme.....	125
2.2.6.2	Direkte Arzneistoffaufnahme.....	126
2.2.7	Hoch-Leistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	127
2.2.7.1	Prinzip	127
2.2.7.2	Quantifizierung von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	127
2.2.7.2.1	Das Messsystem	127
2.2.7.2.2	Stationäre Phase	128
2.2.7.2.3	Elutionsmittel	128
2.2.7.2.4	Parameter.....	128
2.2.7.2.5	Interner Standard	128
2.2.7.2.6	Auswertung	128
2.2.7.3	Bestimmung des linearen Messbereichs	129
2.2.8	Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA)	129
3.	ERGEBNISSE	130
3.1	Entwicklung einer Methode für den Nachweis von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	130
3.2	OCT1 als Aufnahmetransporter für Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	133
3.3	Carrier-unabhängige Membrandurchlässigkeit.....	133
3.4	Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme durch OCT1	135
3.5	Generierter und Charakterisierung von OCT2	141
3.5.1	Generierung vom pcDNA5::OCT2-Konstrukt	141
3.6	Generierung von OCT2-überexprimierenden Zellen	143
3.6.1	Charakterisierung der OCT2-überexprimierenden Zellen.....	143
3.6.2	Chromosomale Integration	143

3.6.3	Sequenzierung.....	145
3.6.4	RNA-Expression.....	145
3.6.5	Funktionsfähigkeit	146
3.7	OCT2 als Aufnahmetransporter von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	148
3.7.1	Venlafaxin-Aufnahme durch OCT2	148
3.7.2	O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme durch OCT2 und SNP-Effekte	149
4.	DISKUSSION	152
4.1	O-Desmethylvenlafaxin als OCT1-Substrat	152
4.2	O-Desmethylvenlafaxin als OCT2-Substrat	155
4.3	Klinische Relevanz der Ergebnisse	156
4.4	Probleme bei der Versuchsdurchführung.....	157
4.5	Potenzielle Substrate für die OCTs	158
4.6	Fazit.....	158
	LITERATURVERZEICHNIS	159
	CURRICULUM VITAE	166

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Wirkmechanismus der oralen Antikoagulantien.....	17
Abbildung 2: Übersicht aller Teilnehmer nach Studienarm.....	39
Abbildung 3: Subjektives Sicherheitsempfinden	51
Abbildung 4 : Zeit im therapeutischen Bereich	52
Abbildung 5 A–E: Regression von Alterskategorie und der Häufigkeit relevante Fragen richtig beantwortet zu haben	60
Abbildung 6 A-D: Wissenszuwachs der Angehörigem	64
Abbildung 7: Chemische Strukturen von Tramadol, O-Desmethyltramadol, Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	87
Abbildung 8: Model des rOct1	89
Abbildung 9: Chromatogramm von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	131
Abbildung 10: Kalibriergerade für Venlafaxin.	131
Abbildung 11: Kalibriergerade für O-Desmethylvenlafaxin	132
Abbildung 12: Carrier-unabhängige Membrandurchlässigkeit von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	135
Abbildung 13: Messung der Venlafaxin-Aufnahme in OCT1 überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen	136
Abbildung 14: Messung der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme in OCT1 überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen	137
Abbildung 15: Konzentrationsabhängigkeit von O-Desmethylvenlafaxin	138
Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin mittels OCT1	139
Abbildung 17: Durch OCT1 transportierte Fraktion an O-Desmethylvenlafaxin.....	139
Abbildung 18: Messung der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme in OCT1 überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen und häufig auftretenden genetischen Varianten	140

Abbildung 19: Darstellung der Klonierung von OCT2 in den Expressionsvektor pcDNA5.	142
Abbildung 20: Integrationsspezifische PCRs zur Bestätigung der chromosomalen Integration	145
Abbildung 21: Expressionsrate von OCT2 in den stabil-transfizierten HEK T-Rex-Zellen	146
Abbildung 22: (A) Konzentrationsabhängigkeit von ASP^+ , (B) ASP^+ -Aufnahme durch OCT2	147
Abbildung 23: Messung der Venlafaxin-Aufnahme in OCT2-überexprimierenden HEK T-Rex293-Zellen.	149
Abbildung 24: Messung der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme in OCT2-überexprimierenden HEK T-Rex293-Zellen	151

TABELLENVERZEICHNIS

PROJEKT

Tabelle 1: Pharmakokinetik der oralen Antikoagulantien.....	18
Tabelle 2: Einfluss von Polymorphismen in CYP2C9 und VKORC1 auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in oralen Antikoagulantien.....	21
Tabelle 3: INR-Bereich	34
Tabelle 4: Soziodemographische Daten der Patienten	40
Tabelle 5: Indikation für die Einnahme von oralen Antikoagulantien.....	42
Tabelle 6: Auswertung der Wissensfragen für Baseline und Abschluss.....	43
Tabelle 7: Vorher-Nachher-Vergleich (Baseline, Zwischenerhebung, Abschluss)	46
Tabelle 8: Subjektives Sicherheitsempfinden	49
Tabelle 9: Zusammenfassung des gemischten linearen Models zu der Zeit im therapeutischen Bereich	52
Tabelle 10: Aufgetretene Komplikationen während der Studie.....	53
Tabelle 11: Bewertungsfragebogen.....	54
Tabelle 12: Gesamtscore	56
Tabelle 13: Regressionsanalyse	57
Tabelle 14: Regressionsanalyse für Gesamtscore in Fragebogen 3, nur Intervention	58
Tabelle 15: Einfluss der Gruppe auf den Gesamtscore	58
Tabelle 16: Einfluss des Geschlechts	59
Tabelle 17: Soziodemographische Daten der Angehörigen.....	61
Tabelle 18: Gesamtscore für Angehörige.....	62
Tabelle 19: Ergebnisse ausgewählter Wissensfragen der Angehörigen.....	62
Tabelle 20: Variationskoeffizienten der Mittelwerte für die Kalibriergeraden von Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin gemessen im HPLC-System	132

Tabelle 21: Struktur und physiko-chemische Eigenschaften von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	134
Tabelle 22: K_m - und V_{max} -Werte der OCT2-Klone.....	148

DANKSAGUNG

Ich möchte meinem Mentor Prof. Dr. Rustenbeck herzlich für die Unterstützung und Betreuung danken.

Prof. Dr. Brokmöller danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung der Klinischen Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen die erforderlichen Projekte durchgeführt haben zu können. Sein Hinterfragen und seine Anregungen haben diese Arbeit vorangebracht.

Danke an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für das im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK 1034 erteilte Stipendium.

PD Dr. Vormfelde danke ich für die Betreuung im AMTS-Projekt und die mir vermittelten Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens.

PD Dr. Tzvetkov danke ich für die Betreuung im Labor und die anregenden Vortragsrunden.

Prof. Dr. Chenot danke ich sehr für die freundliche Aufnahme in seine damalige Abteilung der Allgemeinmedizin der Universitätsmedizin Göttingen, die angenehme Zusammenarbeit und für die Möglichkeit auf der DEGAM 2012 unser Projekt vorstellen zu können.

Dr. Janka Koschack danke ich herzlich für die Tipps zum wissenschaftlichen Arbeiten, die spannenden Diskussionen, das immer offene Ohr, die Objektivität in ihrer Betrachtungsweise und die motivierenden Worte.

Danke an meine Freundinnen und Kolleginnen Kristin Bokelmann, Karoline Jobst und Valerie O'Brien für die Geduld mit der sie meine vielen Fragen gerade zu Beginn meiner Arbeit beantwortet haben.

Diana Henze danke ich herzlich für das Korrekturlesen und den regen Erfahrungsaustausch.

Zu guter Letzt möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken: Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Huda und Salah Abu Abed, und meinen Freunden, die ununterbrochen an mich geglaubt haben und immer für mich da waren. Ohne deren Unterstützung gäbe es diese Arbeit nicht. Danke.

Projekt I

Effektivität einer komplexen Schulung bei antikoagulierten Patienten

1. EINLEITUNG

1.1 Orale Antikoagulation

1.1.1 Wirkstoffe

Als orale Antikoagulantien werden 4-Hydroxycumarin-Derivate (Dicoumarol und Dicoumarol-Derivate) verwendet. In Deutschland werden die Wirkstoffe Phenprocoumon, bekannt z. B. unter dem Handelsnamen Marcumar[®], und das Warfarin, bekannt unter dem Handelsnamen Coumadin[®], therapeutisch eingesetzt. In den Niederlanden und der Schweiz wird meistens das Acenocoumarol (Sintrom[®]) verschrieben. Hinzu kommen die neuen oralen Antikoagulantien. Derzeit sind in Deutschland das Dabigatran (Pradaxa[®]), als Faktor-IIa-Inhibitor, und das Rivaroxaban (Xarelto[®]) und Apixaban (Eliquis[®]), als Faktor-Xa-Inhibitoren, in Deutschland zugelassen (Osterspey and Zylka-Menhorn 2011). Von den Antikoagulantien abzugrenzen sind die Thrombozytenaggregationshemmer.

1.1.2 Indikation

Wesentliche Indikation für eine orale Antikoagulation sind die Behandlung und Prophylaxe venöser Thrombosen und Lungenembolien sowie die Prophylaxe arterieller Embolien bei Vorhofflimmern oder Herzklappenersatz (Allgaier, Aktories et al. 2009).

1.1.3 Pharmakodynamik

Orale Antikoagulantien wie Phenprocoumon hemmen die Synthese von funktionstüchtigem Prothrombin sowie die der Faktoren VII, IX und X in der Leber (Abbildung 1). Sie sind insofern indirekte Antikoagulantien, als dass sie nicht direkt mit den Gerinnungsfaktoren reagieren, sondern die Synthese dieser Gerinnungsfaktoren hemmen. Sie blockieren die für einen normalen Ablauf der Carboxylierungsprozesse notwendige Regenerierung von Vitamin-K-Epoxid durch kompetitive Hemmung der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase, VKOR (Hirsh, Dalen et al. 2001). Dadurch wird die enzymatische Reduktion von Vitamin-K-2,3-Epoxid, der inaktiven Form von Vitamin-KH₂, gehemmt. Dieses kann somit nicht zu Vitamin K regeneriert werden. Die Regeneration ist allerdings Voraussetzung für die Vitamin-K-abhängige Aktivierung (Carboxylierung) der Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin), VII, IX und X sowie der Proteine C und S. Folglich erzeugen die Vitamin-K-Antagonisten einen Mangel an Vita-

min-KH₂ und wirken dadurch indirekt gerinnungshemmend (Hirsh, Dalen et al. 2001; Allgaier, Aktories et al. 2009).

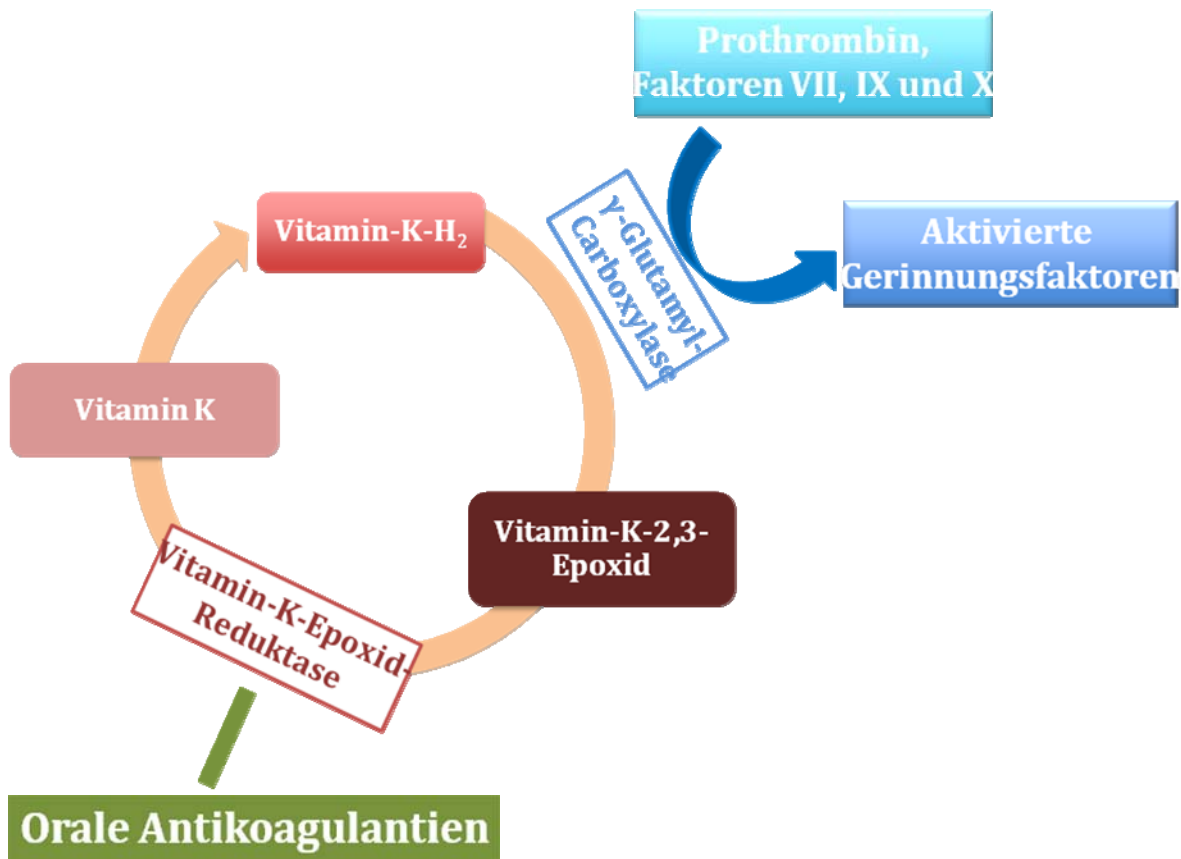


Abbildung 1: Wirkmechanismus der oralen Antikoagulantien

1.1.4 Pharmakokinetik

Die einzelnen Gerinnungsfaktoren sind im Plasma im Überschuss vorhanden und haben unterschiedliche Halbwertszeiten im menschlichen Blutplasma, z. B. hat Faktor VII eine Halbwertszeit von 1–6 h, Faktor IX hat eine Halbwertszeit von 24–28 h, Faktor X nach 38–72 h und Faktor II nach 60–120 h (Van der Meer, Hemker et al. 1968; Rietbrock 2001). Der limitierende Schritt für den Beginn der Wirkung der oralen Antikoagulation nach Beginn der Dosierung ist die Halbwertszeit der Gerinnungsfaktoren. Erst wenn die Konzentration der im Blut vorhandenen Gerinnungsfaktoren unter einem kritischen Wert absinkt, wird die verringerte oder fehlende Neubildung in der Leber manifest (Mutschler 2013). Die Wirkung von Phenprocoumon tritt nach 48 bis 72 Stunden ein (Ansell, Hirsh et al. 2004). Aufgrund der langen Halbwertszeit ist eine Aufsättigung durch eine initiale höhere Dosierung als in der Erhaltungstherapie erforderlich. Zusätzlich zu der verspätet eintretenden Gerinnungshemmung

kann nach Dosierungsbeginn eine verstärkte Gerinnung entstehen, da auch die anti-koagulativen Proteine C und S, die eine kürzere Halbwertszeit besitzen, durch Vitamin-K-abhängige Reaktionen entstehen (Lemmer and Fülgraff 2010). Deshalb muss bei der Einstellung auf Cumarine ein sogenanntes Bridging durchgeführt werden. Cumarinderivate werden enteral fast vollständig resorbiert. Wirkungseintritt und Dauer des therapeutischen Effekts sind abhängig davon, wann in der Leberparenchymzelle eine optimale Cumarinkonzentration erreicht und wie lange sie aufrechterhalten wird (Allgaier, Aktories et al. 2009). Die Halbwertszeiten der Cumarinderivate zeigen starke individuelle Schwankungen (Tabelle 1). Phenprocoumon verfügt mit im Mittel 160 Stunden über die längste Halbwertszeit unter den medizinisch verwendeten oralen Antikoagulantien (Lemmer and Fülgraff 2010). Trotz der Vielzahl der inzwischen identifizierten Metabolite der Cumarine sind die Abbauwege für die einzelnen Verbindungen quantitativ noch nicht zu beurteilen (Allgaier, Aktories et al. 2009). Für alle Verbindungen sind Hydroxylierungsprodukte der aromatischen Ringsysteme beschrieben. Im Urin werden etwa 70% des Phenprocoumons als Glucuronid ausgeschieden, davon 50% als hydroxylierte Metabolite. Der Rest wird biliär ausgeschieden. Das biliär ausgeschiedene Phenprocoumon unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf. Aufgrund der unterschiedlichen pharmakokinetischen Halbwertszeiten der verschiedenen Cumarine und deren Wirksamkeitshalbwertszeiten liegt die jeweilige Wirkungsdauer zwischen drei und zehn Tagen.

Tabelle 1: Pharmakokinetik der oralen Antikoagulantien

Substanz	Erhaltungsdosis (mg)	Halbwertszeit (h)	Zeit bis zur Normalisierung der Gerinnung nach absetzen (d)
Phenprocoumon	1,5-3	130-160	7-10
Warfarin	5-10	25-60	4-6
Acenocumarol	2-12	9	3-4

1.1.5 Verordnungshäufigkeiten

2011 wurden insgesamt 380,3 Millionen Tagesdosen (DDD) an Phenprocoumon (376,3 DDD) und Warfarin (4,0 DDD) verordnet (Schwabe and Paffrath 2012). Orale Anti-

koagulantien werden seit mehreren Jahrzehnten hauptsächlich zur Prävention und Therapie von venösen Thromboembolien eingesetzt und sind die wichtigsten ambulant angewendeten Antikoagulantien für die Prophylaxe von embolisch bedingten Schlaganfällen bei Vorhofflimmern. Thromboembolische Gefäßverschlüsse treten sowohl in den Arterien als auch in den Venen auf. Nach den koronaren und zerebralen sind venöse Thromboembolien die dritthäufigste Gefäßerkrankung. Die jährliche Inzidenz an tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien beträgt etwa 1,5 Fälle pro 1000 Einwohner (Alban 2007).

1.1.6 Herausforderung der oralen Antikoagulation

Die Herausforderung der Therapie mit oralen Antikoagulantien besteht darin, die Antikoagulation optimal einzustellen. Die jährliche Inzidenz schwerer Blutungen bei antikoagulierten Patienten beträgt 0,3 bis 4% (Hart, Tonarelli et al. 2005; Torn, Bollen et al. 2005). Die Dosierung erfolgt in Deutschland meist durch den Hausarzt. Seit 1986 besteht für die Patienten die Möglichkeit, die Blutgerinnung selbst zu messen und die Dosis anzupassen. Die Selbstmessung wird zunehmend genutzt, ist jedoch wegen der hohen Schulungsanforderungen und Eigenverantwortung nicht für jeden Patienten geeignet. Es bestehen auch Probleme bei der Kostenübernahme für Selbstmessgeräte und die relativ teuren Teststäbchen, die in das Arzneimittelbudget fallen (Braun, Völler et al. 2009; Garcia-Alamino, Ward et al. 2010). Gründe für die Krankenkassen zur Kostenübernahme sind schlechte Venenverhältnisse, Komplikationen in der bisherigen konventionellen Betreuung, Schwierigkeiten, die Arztpraxis in regelmäßigen Abständen aufzusuchen und eine Dauerantikoagulation bei Kindern (Herz Zentrum Göttingen). Das Monitoring erfolgt mittels der INR-Wert-Messung (International Normalized Ratio). Die Prothrombinzeit (Synonym: Quick-Wert) ist eine ältere, aber noch verbreitete Methode zur Überwachung der Cumarintherapie. Aufgrund der unterschiedlichen, weltweit nicht vergleichbaren Thromboplastine wurde ein international vergleichbarer Standardwert erarbeitet, die International Normalized Ratio (INR). An sie wird die Dosierung des Phenprocoumons angepasst. Ein gesunder Mensch hat einen INR-Wert von „1“ (Quickwert von 100%). Die Gerinnung dauert hier rund 20 Sekunden. In Abhängigkeit der Indikation wird für den Patienten mit oraler Antikoagulation ein INR-Zielbereich festgelegt. Zum einen soll die erhöhte Gerinnselformung verhindert werden, gleichzeitig soll das Blutungsrisiko für den Patienten möglichst gering sein. In der Regel werden Werte zwischen 2 und 3 (Hirsh, Dalen et al. 2001; AWMF 2013) angestrebt. Das bedeutet, dass das Blut 2- bis 3-mal langsamer gerinnt als normal. Die Verträglichkeit von oralen Antikoagulantien wird durch zahlrei-

che patientenbezogene Faktoren beeinflusst. Es ist bekannt, dass die inter-individuellen Unterschiede in der Vitamin-K-Antagonisten-Erhaltungsdosis auf genetische Varianten in CYP2C9 und VKORC1 (Tabelle 2) zurückzuführen sind (Becquemont 2008). So wird das S-Warfarin, das stärker aktive Enantiomer, hauptsächlich über CYP2C9 metabolisiert. Auch Acenocoumarol wird hauptsächlich durch CYP2C9 verstoffwechselt. Phenprocoumon hat die kleinste CYP2C9-Clearance und wird in gleichem Ausmaß von CYP2C9 und CYP3A4 verstoffwechselt. Im Urin werden 70% der Dosis als Glucoronid ausgeschieden, davon 20% konjugierte Muttersubstanz und 50% konjugierte Metaboliten (de Vries, Raedsch et al. 1988). In den 90iger Jahren wurden zwei Allelvarianten von CYP2C9 identifiziert, die zu einem Funktionsverlust von CYP2C9 führen: CYP2C9*2 (Arg 144 zu Cys) und CYP2C9*3 (Ile 359 zu Leu). Beide Polymorphismen sind mit einer verminderten S-Warfarin Clearance assoziiert, was bedeutet, dass niedrigere Dosen benötigt werden, um die therapeutischen Konzentrationen und den gewünschten INR-Zielbereich aufrechtzuerhalten. Dieser Einfluss wurde auch für Acenocoumarol und Phenprocoumon beobachtet. Im Vergleich zu Warfarin hat die Variante CYP2C9*2 einen weniger entscheidenden Einfluss auf die Verstoffwechselung von Acenocoumarol und Phenprocoumon (Hummers-Pradier, Hess et al. 2003; Kirchheiner, Ufer et al. 2004). Das Zielenzym für die oralen Antikoagulantien ist die Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKORC1). Insgesamt wurden sowohl Polymorphismen, die mit einer Resistenz gegenüber Warfarin als auch Polymorphismen mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber oralen Antikoagulantien assoziiert sind, identifiziert. Träger solcher Polymorphismen haben eine verminderte Expression von VKORC in der Leber. Solche Patienten benötigen eine geringere Dosis an Warfarin, Acenocoumarol bzw. Phenprocoumon, um den gewünschten INR-Bereich zu erreichen.

Tabelle 2: Einfluss von Polymorphismen in CYP2C9 und VKORC1 auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in oralen Antikoagulantien

Cyp2C9				
	Pharmakokinetik	Tägliche Dosis	Zeit bis zur stabilen INR	Überdosierung und Blutungsrisiko
Phenprocoumon	geringfügig	geringfügig	Geringfügig	geringfügig
Warfarin	Ja	Ja	Ja	Ja
Acenocumarol	Ja	Ja	Ja	Ja
VKORC1				
	Pharmakokinetik	Tägliche Dosis	Zeit bis zur stabilen INR	Überdosierung und Blutungsrisiko
Phenprocoumon	Ja	Ja	Keine Daten	Ja
Warfarin	Ja	Ja	Ja	Ja
Acenocumarol	Ja	Ja	Ja	Ja

Tabelle modifiziert nach L. Becquemont (Becquemont 2008).

Auch manche Begleiterkrankungen interagieren mit oralen Antikoagulantien. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder koronare Herzerkrankung können zu einer erhöhten Blutungsgefahr führen, so dass im Einzelfall geprüft werden muss, ob bei einem Patienten das Blutungsrisiko durch Antikoagulation akzeptabel ist. Neben patientenbezogenen Faktoren interagiert der Vitamin-K-Gehalt der Nahrung mit der oralen Antikoagulation, da Vitamin K aus der Nahrung mit den Vitamin-K-Antagonisten um die Bindungsstelle an der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase konkurriert (Franco, Polanczyk et al. 2004). Zusätzlich ist bei chirurgischen und zahnärztlichen Eingriffen das Blutungsrisiko zu beachten. Gerade deshalb lässt sich sagen, dass neben der regelmäßigen Kontrolle der Blutgerinnung eine Erhöhung der Patientenkompetenz durch richtige Schulung unabdingbar ist. Strukturierte Patientenschulung zur oralen Antikoagulation wird bereits seit 30 Jahren empfohlen (Scalley, Kearney et al. 1979).

1.2 Patientenschulung

1.2.1 Patientenschulung allgemein

Patienten, die besser informiert sind, sind im Allgemeinen erfolgreicher im Umgang mit gesundheitsrelevanten Entscheidungen und halten ihre Medikationspläne besser ein (DiMatteo, Giordani et al. 2002; Smith, Rublein et al. 2003; Brock and Smith 2007). Arzneimitteltherapiesicherheit durch Förderung der Patientenkompetenz und Selbstmanagement finden zunehmend Beachtung. Auch das Bundesministerium für Gesundheit hat darauf reagiert und in Kooperation mit Akteuren im Gesundheitswesen den Aktionsplan 2008/2009 zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit in Deutschland erarbeitet. Mit dem Aktionsplan zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit in Deutschland werden notwendige Aktivitäten zusammengefasst, mit denen insbesondere die Voraussetzungen für die bestimmungsgemäße Anwendung von Arzneimitteln verbessert werden sollen (BMG 2007). Ein Thema ist die Erhöhung der Arzneimitteltherapiesicherheit durch Förderung der Patientenkompetenz. In der klinischen Praxis spielt die Förderung der Patientenkompetenz eine zunehmend wichtigere Rolle, so z. B. beim Selbstmanagement von oralen Antikoagulantien. Das Gerinnungs-Selbstmanagement mithilfe spezieller kleiner Messgeräte ist bereits seit mehr als 25 Jahren möglich. Seit 1994 steht das erste CoaguChek-System für die Selbstkontrolle der oralen Antikoagulation zur Verfügung. Im Jahr 2011 praktizierten in Deutschland bereits mehr als 160 000 Patienten das Gerinnungs-Selbstmanagement und die Tendenz ist weiter steigend. In einer systematischen Übersichtsarbeit wurde dargelegt, dass Selbstmanagement die Qualität der oralen Antikoagulation verbessert. Bei Patienten, die ihren INR-Wert selber kontrollieren und die Dosis anpassen, treten weniger thromboembolische Ereignisse und Todesfälle auf (Heneghan, Alonso-Coello et al. 2006; Christensen, Johnsen et al. 2007; Wells, Brown et al. 2007). Unterschiedliche Gruppen verstehen unter dem Begriff Patientenschulung unterschiedliche Dinge: So meint man zum Beispiel damit „alle Schulungsmaßnahmen, die therapeutische, gesundheitsbezogene und gesundheitsfördernde Aspekte beinhalten und auf Patienten ausgerichtet sind“ (Visser, Deccache et al. 2001). Eine weitere Definition sieht die Patientenschulung als einen Prozess der Information von Patienten und deren Familienangehörige über die Erkrankung, mit dem Ziel, dass die Chancen der Heilung des Patienten steigen und der Krankenhausaufenthalt verbessert wird (Bartlett 1985). Eine *Delphi Group On Patient Education* (Strobl, Kuffner et al. 2009) definiert Patientenschulung als eine erlernte Erfahrung unter Verwendung einer Kombination aus Unterrichten, Beraten sowie unter An-

wendung von Techniken zur Verhaltensmodifikation, welche das Wissen und das gesundheitsrelevante Verhalten der Patienten beeinflusst, und involviert einen interaktiven Prozess, der Patienten unterstützt, aktiv an ihrer Gesundheitsfürsorge teilzunehmen (Bartlett 1986). Die Definitionen sind doch recht unterschiedlich und zeigen dass Patientenschulung recht unterschiedlich erfolgen kann. Zwar haben alle das gleiche Ziel, nämlich Inhalte zu erfassen, doch in unterschiedlichem Ausmaß und mit unterschiedlichen Folgen für die weitere Behandlung.

Patientenschulung scheint sinnvoll zu sein. Für viele Indikationsbereiche liegt Evidenz für den Nutzen von Patientenschulung vor, beispielhaft sind Schulungen zur koronaren Herzkrankheit (Sebregts, Falger et al. 2000; Clark, Hartling et al. 2005), Diabetes mellitus (Norris, Lau et al. 2002; Ellis, Speroff et al. 2004; Gillies, Abrams et al. 2007), Rückenschmerzen (Guzman, Esmail et al. 2001), rheumatischen Erkrankungen, Asthma bronchiale (Gibson, Powell et al. 2003) und onkologischen Erkrankungen (Rehse and Pukrop 2003).

Als ein Ziel der Patientenschulung gilt es, die Folgen chronischer Krankheiten durch gezielte Förderung von Compliance, Selbstmanagement und Empowerment (Eigenverantwortlichem Handeln) zu verringern und die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern (Ströbl, Küffner et al. 2007).

In mehreren Arbeiten konnte ein deutlicher Wissensanstieg nachgewiesen werden, die praktische Umsetzung des Wissens in den Alltag fehlte jedoch. Daraus wurde geschlossen, dass es auch verhaltensorientierter Interventionen bedarf, wenn tatsächlich eine Verhaltensänderung erreicht werden soll (Jaarsma, Halfens et al. 1999; Riemsma, Taal et al. 2004; Michie, Abraham et al. 2009). Nicht nur für den Patienten ist eine richtige Patientenschulung von Vorteil. Patientenschulung kann auch Krankenhauskosten durch Verkürzung der Aufenthaltsdauer senken und Angst, Schmerz, Komplikationen und den Bedarf an Schmerzmitteln reduzieren (Bartlett 1985), aber auch zu verminderter Arbeitsunfähigkeit wie z. B. bei Asthma bronchiale führen (Gibson, Powell et al. 2003).

Ein Problem bei der Entwicklung einer Patientenschulung ist, dass in Veröffentlichungen die Schulungen und ihre Durchführung kaum beschrieben sind. Nur selten wurden die Faktoren, die über Erfolg oder Misserfolg von Schulungen entscheiden, untersucht. Die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie beschreibt erstmalig einige Faktoren für eine erfolgreiche Schulung (Lind-Albrecht 2006): So ist verständlicherweise die Sprache sehr wichtig. Wortwahl und Satzbau sollten einfach sein, Fachbegriffe vermieden bzw. wenn erforderlich, erklärt

werden. Erfahrungen und Meinungen der Teilnehmer sollten erfragt und aufgenommen werden. Inhaltlich sollten Schulungen auf die wesentlichen Inhalte gekürzt werden. Statt detailliertem Wissen sollten klare Handlungsanweisungen vermittelt sowie die Motivation des Patienten erhöht werden. Zeit für Wiederholungen sollte veranschlagt werden, um das Gelernte zu verfestigen. Schriftliches Begleitmaterial sollte ausgehändigt werden. Bei der Schulung sollten die Gruppen auf zehn Teilnehmer begrenzt sein. Ein interdisziplinäres Team, qualifizierte Mitarbeiter und ein eigener Schulungsraum mit entsprechender Ausstattung, wie z. B. Flip Charts oder Overhead-Projektor, sind Voraussetzung. Die Schulung sollte strukturiert sein und Pausen vorgesehen werden. Auch Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Schulung sollten eingeführt werden, wie z. B. Hospitation oder Teambesprechung (Manschwetius 2003). In einer separaten Analyse verschiedener Reviews erarbeitete Bartlett folgende Elemente als Charakteristika von hochqualitativen Patientenschulungsprogrammen (Bartlett 1986):

1. Die Schulung basiert auf einer Bewertung des Lernbedarfs und den Hindernissen beim Befolgen des Regimes.
2. Der Patient muss aktiv am Schulungsprogramm teilnehmen.
3. Die Schulung sollte darauf fokussieren, was der Patient zu tun hat und nicht nur, was der Patient wissen sollte.
4. Eine Kombination verschiedener Schulungsmethoden ist sinnvoll und sollte aus Unterrichten, Beraten, Instruktionshilfen, Diskussionen mit sich ebenbürtigen Patienten und Verhaltensmodifikationstechniken bestehen.
5. Patientenschulung erfolgt individualisiert. Jeder Patient sollte lernen sich selbst kritisch zu betrachten.
6. Instruktionshilfen und Medien dienen als Ergänzung, nicht um das persönliche Annähern an den Patienten zu ersetzen.
7. Familienangehörige und Freunde sollten involviert werden.
8. Die Schulung sollte über einen längeren Zeitraum und nicht nur für eine kurze Zeitspanne durchgeführt werden.

Patientenschulung scheint leicht durchzuführen zu sein, aber nur schwer auf einem guten Niveau (Bartlett 1989). Das Problem scheint hierbei weniger in der Durchführung, sondern vielmehr in der Ausgestaltung zu liegen. Dennoch gibt es Beispiele für erfolgreiche Patientenschulungsprogramme. So können Interventionen, deren Grundpfeiler die Patientenschulung bildet, den eigenverantwortlichen Umgang mit der Krankheit von Patienten mit Herzinsuffizienz (Grossmann and Mahrer-Imhof 2008) verbessern. Die Effektivität der

rheumatologischen Patientenschulung ist inzwischen gut belegt. Hier zeigt sich, dass die an die individuell angepasste Gruppenkonstellation strukturierte und erlebnisorientierte Schulung, Wissen und Fertigkeiten zur Selbsthilfe vermittelt. Über diesen Weg gelingt ein insgesamt verbessertes und zugleich kostengünstigeres Krankheitsmanagement (Lind-Albrecht 2006).

1.2.2 Video-unterstützte Patientenschulung

Patientenschulung kann durch unterschiedliche Medien erfolgen, z. B. schriftlich in Form einer Broschüre, verbal, z. B. durch Präsentationen oder ein Arzt-Patienten-Gespräch. Auch Multimedia-Elemente werden zunehmend eingesetzt. Im digitalen Zeitalter gewinnen audiovisuell gestützte Schulungen, wie z. B. im Internet oder auf DVD, immer mehr an Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass diese Technologien hinsichtlich ihrer Effektivität genauso gut, wenn nicht sogar überlegen gegenüber den herkömmlichen Methoden (z. B. Gespräch, Broschüre) sind. So wurden zwei Gruppen mit Patienten, die an einer arteriellen Gefäßerkrankung leiden, miteinander verglichen, deren körperliche Aktivität gesteigert werden sollte. Während die Gruppe, die ein persönliches Gespräch über peripher arteriosklerotische Gefäßerkrankungen erhielt, keine Veränderung zeigte, erhöhte sich die Laufgeschwindigkeit der Patienten in der Gruppe, denen zuvor ein Video mit einer Übersicht über peripher arteriosklerotische Gefäßerkrankungen gezeigt wurde, um 8,5% (Collins, Krueger et al. 2009). Wenn man schult, werden 75% des Erlernten visuell, 13% durch Hören und der Rest durch andere Sinne aufgenommen. Durch die Kombination aus Sehen und Hören haben Patienten eine erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber dem Geschulten und können dieses besser aufnehmen und behalten (Albert, Buchsbaum et al. 2007). Bestenfalls können dadurch Personalkosten und Zeit im Gesundheitssystem gespart werden (Ryan, Pictor et al. 2008). Zudem können Filme zum Mitnehmen oder im Internet angeboten werden, sodass Patienten unabhängiger werden und sich das Video zu Hause und gemeinsam mit Angehörigen anschauen können (Gysels and Higginson 2007). Videos können so gestaltet werden, dass sie unterhaltsam sind, der Inhalt standardisiert, vollständig, objektiv und klar ist und sie auch von Menschen mit geringer bzw. keiner Lese- und Schreibfähigkeit verwendet werden können. Sie brauchen keine große Zeitzuwendung vom Arzt und können wiederholt angeschaut werden (Green and Fost 1997). Außerdem können Videos in alle Sprachen übersetzt und somit auch für Patienten, die aufgrund fehlender Sprachkenntnisse normalerweise nicht oder nur unzureichend geschult werden können, verfügbar gemacht werden. Videotapes haben aber auch Nachteile.

Zum einen ist die Produktion oft kostenintensiv. Videos lassen sich nur schwer bei neuen Erkenntnisgewinnen aktualisieren. Außerdem besitzen sie einen starren Aufbau, der meist aus einem Anfang, Mittelteil und dem Ende besteht (Green and Fost 1997). Insgesamt kann man Videos in drei unterschiedliche Gruppen klassifizieren: 1. Videos, die als Hilfe beim Treffen von Entscheidungen bezüglich der Behandlung dienen, 2. Aufklärungsvideos, die z. B. die Angst vor einer geplanten Operation nehmen sollen oder helfen, mit dem Schicksal der Krankheit umzugehen, 3. Videos, die hauptsächlich Wissen vermitteln und dem Patienten helfen, mit seiner Krankheit und der dazu nötigen Behandlung umzugehen, wie z. B. Einnahmehäufigkeit, Ernährungsvorschrift und Interaktionen (Krouse 2001).

1.2.3 Patientenschulung bei oralen Antikoagulantien

Patienten, die ein geringes Verständnis für ihre Erkrankungen und potenzielle Nebenwirkungen der erforderlichen Medikamente haben, neigen eher dazu, ihre Therapie nicht richtig einzuhalten, als Patienten, die geschult wurden (Ryan, Byrne et al. 2008). Bisher gibt es eine Reihe von Erfahrungen mit Schulungen für Patienten mit oraler Antikoagulation. Jedoch ist keines dieser Programme unmittelbar im hausärztlichen Bereich einsetzbar (York, Agarwal et al. 2003; Kagansky, Knobler et al. 2004; Henn Cde, Rabelo et al. 2008; Wofford, Wells et al. 2008). Die meisten Schulungen finden in Krankenhäusern und tendenziell an jüngeren Patienten statt. Zudem wurde der Wissenszuwachs nur unmittelbar nach der Schulung und nicht über einen längeren Zeitraum gemessen.

1.3 Ziel der Studie

Ziel der Studie ist die Untersuchung des Effekts eines komplexen Schulungsprogramms zur Förderung der Patientenkompetenz von Patienten mit oraler Antikoagulation. Dazu sollen der Wissenszuwachs, die Zeit im therapeutischen Bereich, das Auftreten von Komplikation und die Veränderung der Lebensqualität der Patienten betrachtet werden.

1.3.1 Ethik

Das Studienprotokoll und die weiteren Dokumente für das des Projekts wurden der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen vorgelegt. Im abschließenden Schreiben (November 2012, Antragsnummer 2/9/190) wurde das Projekt ohne Auflagen positiv bewertet.

1.3.2 Förderung

Die Studie wurde durch das Bundesministerium für Gesundheit gefördert (Förderkennzeichen: 01GX0706).

2. METHODIK

Die Methodik der Studie wurde zuvor in einer Methodenpublikation der Arbeitsgruppe beschrieben (Hua, Vormfelde et al. 2011).

2.1 Rekrutierungsprozess/Teilnehmer

Insgesamt 85 Praxen im Landkreis Göttingen, Northeim und Umgebung sowie in Braunschweig und Umgebung wurden angeschrieben und eingeladen, an der Studie teilzunehmen. Teilnehmen durften alle Patienten dieser Praxen, die mit Phenprocoumon oral antikoaguliert wurden, bzw. deren pflegende Angehörige, wenn sie folgende Kriterien erfüllten:

1. Die Patienten mussten mindestens 18 Jahre alt sein.
2. Die Patienten mussten einwilligungsfähig sein.

Ausgeschlossen wurden:

1. INR-Selbstmesser,
2. Pflegeheimbewohner,
3. Patienten mit unzureichenden Deutschkenntnissen.

2.2 Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine Cluster-randomisiert kontrollierte Studie. Es wurden nicht individuelle Probanden, sondern ganze Gruppen (Cluster) von Probanden zufällig auf Interventions- und Kontrollgruppe aufgeteilt, wobei jedoch die Zielgrößen weiterhin an den individuellen Probanden erhoben werden. In dieser Studie stellt jede Praxis ein Cluster dar. Hauptgründe hierfür waren, dass beim individuellen Randomisieren die Gefahr der Kontami-

nation bestünde. Patienten der Kontrollgruppe hätten einen Teil der Intervention mitbekommen und sich mit anderen Patienten aus dem Interventionsarm über die Intervention und das daraus Erlernte unterhalten können (Chenot 2009). Die Studie war nicht verblindet.

2.3 Intervention

Die Intervention bestand aus einer komplexen persönlichen Schulung durch eine medizinische Fachangestellte, die durch ein Video, eine Broschüre und durch einen Fragebogen, den der Patient eigenhändig auszufüllen hatte, standardisiert wurde. Die medizinische Fachangestellte führte zunächst dem Patienten das Video in einem ruhigen Raum auf einem Computer, Fernseher oder Tablet-Computer vor. Im Anschluss daran erfolgte ein persönliches Gespräch mit einer medizinischen Fachangestellten. Die Informationen in Video und Broschüre basieren auf aktueller wissenschaftlicher Literatur.

2.3.1 Video

Das Video mit dem Titel „Gerinnungshemmer – Was sollte ich darüber wissen?“ wurde von den Abteilungen Klinische Pharmakologie und Allgemeinmedizin der Universitätsmedizin Göttingen in Zusammenarbeit mit der Filmproduktionsfirma Imago (Göttingen) produziert. Es ist 20 Minuten lang und derzeit auf CD erhältlich und auf der Internetseite der Universität Göttingen abrufbar:

<http://www.allgemeinmedizin.med.uni-goettingen.de/de/content/forschung/105.html>.

Das Drehbuch wurde von den Mitarbeitern der Studie erstellt. Auch die Schauspieler sind zum Großteil Mitarbeiter im Projekt.

Das Video besteht aus verschiedenen Sequenzen. Leitfaden ist ein Patienten-Arzt-Gespräch, wobei Frau Queiser eine Patientin, im Film mit dem Pseudonym Frau Kaufmann benannt, spielt, die eine Behandlung mit Phenprocoumon beginnen soll. Ihr Hausarzt Prof. Chenot (sich selbst spielend) klärt sie zu der Einnahme auf und beantwortet ihre einzelnen Fragen. Dazwischen werden Sequenzen von einem Klinischen Pharmakologen, Herrn PD. Vormfelde gezeigt, in denen er auf die Antworten von Prof. Chenot eingeht und diese ausführlicher erläutert. Zusätzlich werden einzelne Sequenzen aus Alltagssituationen gezeigt, wie der Besuch in einem Supermarkt, in der Apotheke oder beim Zahnarzt.

Folgende Themen werden im Video behandelt:

- Einnahmedauer,
- Kontrolle der Blutgerinnung,
- Ernährung bei oraler Antikoagulation,
- Schmerzmittel,
- was bei einer vergessenen Einnahme zu tun ist,
- Erkennen von Warnsymptomen,
- Einflussfaktoren,
- Hinweis auf Einnahme von oralen Antikoagulantien.

2.3.2 Rekapitulation mit der medizinischen Fachangestellten

Im Anschluss an das Video wiederholte eine medizinische Fachangestellte der Praxis mithilfe einer Broschüre die Inhalte des Videos. Dabei hatte der Patient die Möglichkeit, Fragen zu stellen und auf nicht Verstandenes einzugehen. Anschließend wurde zur Wiederholung und Vertiefung ein einfacher Fragebogen ausgefüllt, um das Erlernte zu verfestigen. Motivation für die medizinische Fachangestellte war eine Entlohnung in Höhe von 50 Euro für jeden Patienten, der die Studie abschloss. Der Patient durfte nach der persönlichen Schulung die Broschüre mit nach Hause nehmen und behalten.

2.3.3 Broschüre

Die Broschüre wurde von den Mitarbeitern der Studie erstellt. Sie besteht aus 14 Seiten. Inhaltlich hat sie genau dieselben Schwerpunkte wie das Video. Es werden dieselben Themen in Form von Frage und Antwort behandelt. Bei der Erstellung legten wir Wert auf eine klare und einfache Ausdruckweise. Nur die wichtigsten Informationen wurden kompakt dargestellt. Außerdem finden sich am Ende der Broschüre Literaturempfehlungen und Links zu Internetseiten zum Nachlesen über orale Antikoagulantien.

2.4 Kontrollgruppe

Den Patienten in der Kontrollgruppe wurde lediglich die Broschüre durch die medizinische Fachangestellte ausgehändigt.

2.5 Studienendpunkte

Folgende Studienendpunkte wurden vor Beginn der Studie definiert:

Primär

- Prozentsatz der richtig beantworteten Fragen und Wissensanstieg nach sechs Monaten (Vergleich der zwei Studienarme)
- Zeit im therapeutischen Bereich, also die Zeit in der der Patient im Bereich des angestrebten INR-Wertes lag
- Auftreten von Komplikationen, insbesondere solche die in Zusammenhang mit der Therapie mit oralen Antikoagulantien stehen, wie Blutungen und Thrombosen
- Die Nachhaltigkeit der Studie

Sekundär

- Relativer Wissenszuwachs zur oralen Antikoagulation im Vergleich der Studienarme
- Absoluter Wissenszuwachs zur oralen Antikoagulation im Vergleich der Studienarme
- Änderung der Lebensqualität hinsichtlich der oralen Antikoagulation

2.6 Messinstrumente und Messzeitpunkte

2.6.1 Baseline

Die Patienten füllten vor der Schulung Fragebögen zu demographischen Daten, Sicherheitsempfinden und behandlungsrelevantem Wissen aus. Auch nach der Indikation für die oralen Antikoagulantien und bereits aufgetretenen Komplikationen wurde gefragt. Die Wissensfragen deckten sich mit den Inhalten des Videos und der Broschüre.

Erst im Anschluss an den Fragebogen bekamen die Patienten die Intervention aus Video und persönlichem Gespräch beziehungsweise in der Kontrollgruppe die Broschüre.

2.6.2 Zwischenerhebung

Einen Monat, nachdem die Schulung stattgefunden hatte, wurde anhand derselben Fragen wie im Baseline-Fragebogen in der Interventionsgruppe das Wissen und subjektive Sicherheitsempfinden erhoben.

2.6.3 Abschluss

Sechs Monate nach dem individuellen Schulungstermin wurden sowohl in der Kontroll- als auch in der Interventionsgruppe das subjektive Sicherheitsempfinden, die Indikation und das Wissen wie im Baseline-Fragebogen abgefragt. Außerdem wurde nach Präferenzen für ein zukünftiges Schulungsprogramm gefragt. Aufgetretene Komplikationen der letzten sechs Monate sollten notiert werden.

Nach dem Ausfüllen des Abschlussfragebogens war die Studie für den Patienten beendet.

Alle drei Fragebögen finden sich im Anhang.

2.6.4 Zeit im therapeutischen Bereich

Die INR-Werte aus den routinemäßigen Messungen in der Hausarztpraxis wurden von sechs Monaten vor Beginn des individuellen Schulungstermins bis zum Ende der Studie zur Bestimmung der Zeit im therapeutischen Bereich von den medizinischen Fachangestellten notiert. Das entsprach einem Zeitraum von zwölf Monaten.

2.6.5 Komplikationen

Das Auftreten von Komplikationen während der Studie wurde von den medizinischen Fachangestellten dokumentiert.

2.7 Statistische Auswertung

Die Antworten der Fragebögen wurden in einer Excel-Tabelle, sortiert nach Patienten, Praxis und Studienarm, eingegeben. Die Eingabe erfolgte durch eine Study Nurse und zwei wissenschaftliche Mitarbeiter. Nach der Eingabe wurden die Daten kontrolliert, wobei eine Person die Antwort vorlas, während eine andere Person am Monitor die Antworten verglich. Die Daten wurden in die Statistiksoftware SPSS statistics (Version 19.0) von IBM eingelesen und hier die komplette statistische Auswertung durchgeführt. Bei der Auswertung der Daten wurden nur die Patienten berücksichtigt, die die Studie abgeschlossen haben (per protocol).

2.7.1 Demographische Daten

Die demographischen Daten wurden größtenteils deskriptiv ausgewertet (Häufigkeiten, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum,). Des Weiteren wurden die Daten zwischen den Studienarmen verglichen und auf Unterschiede getestet.

2.7.2 Wissensfragen

Die Wissensfragen wurden innerhalb der einzelnen Gruppen und zum Vergleich der beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten mithilfe des Chi-Quadrat-Tests ausgewertet, wobei genau eine Antwort als richtig zutrifft und alle anderen Antworten als falsch zusammengefasst werden. Ein Nichtbeantworten einer Frage und Ankreuzen der Antwort „weiß ich nicht“ galt als falsch. Für die meisten Fragen wird kein signifikanter Unterschied zu Beginn der Studie zwischen Kontrolle und Intervention angenommen. Wenn man nun einen signifikanten Unterschied zwischen Intervention und Kontrolle nach sechs Monaten nachweisen kann, lässt sich von einem eindeutigen Ergebnis sprechen. Verglichen wurden daher die Ergebnisse in den beiden Gruppen am Ende der Untersuchung. Wenn sich die Ergebnisse in Kontroll- und Interventionsarm zu Beginn der Untersuchung unterschieden, wurden die Ergebnisse in den beiden Armen zusätzlich mit dem Cochran-Mantel-Haenszel-Test miteinander verglichen.

2.7.2.1 Gesamtscore

Für die Wissensfragen wurde ein Gesamtscore festgelegt, wobei es für jede richtig beantwortete Frage einen Punkt gab. Auch für die Fragen mit Mehrfachantworten gab es für jede richtig angekreuzte Aussage einen Punkt. Für falsch beantwortete Fragen gab es keinen Punkt. Wenn die falsche Antwort einen Einfluss auf die Einnahme hat, wurde ein Punkt abgezogen. Konkret ist hier die Frage nach Vitamin-K-reichen Lebensmittel gemeint, da ein Patient davon ausgehen könnte, dass er mit Nahrungsmitteln, die wenig Vitamin K enthalten, die er aber für Vitamin-K-reich hält, seinen Vitamin-K-Spiegel konstant hält, es jedoch dadurch zu beträchtlichen Schwankungen im Vitamin-K-Spiegel kommen könnte. Insgesamt ließ sich dadurch ein Gesamtscore von mindestens -8 Punkten und maximal 27 Punkten erreichen. Der Score wurde auf Zusammenhänge mit unterschiedlichen Faktoren mittels linearer Regression untersucht. Bei den untersuchten Faktoren handelte es sich um Wissensseinschätzung, Geschlecht, Altersgruppe und Schulbildung, wobei die Patienten dazu nicht in Kategorien eingeteilt wurden, um nicht an Power zu verlieren, sondern jede mögliche Kategorie aus dem Fra-

gebogen genommen wurde. Diese wurden erst für jede unabhängige Variable einzeln und anschließend zusammen mit der schrittweisen Regressionsfunktion in SPSS durchgeführt. Außerdem wurden Regressionen zu einzelnen Fragen unternommen.

2.7.3 Subjektives Sicherheitsempfinden

Die Fragen nach dem subjektiven Sicherheitsempfinden wurden mittels *t*-Test ausgewertet, dabei die Mittelwerte der Antworten verglichen, wobei die Antwortmöglichkeiten als metrisch skaliert betrachtet wurden (jeweils von 1 bis 4, wobei 1 = „starke Ausprägung“ und 4 = „keine Ausprägung“ darstellt). Es wurde kein signifikanter Unterschied zu Beginn der Studie zwischen Kontrolle und Intervention vermutet. Wenn sich doch ein Unterschied zwischen Kontroll- und Interventionsarm zu Beginn der Untersuchung zeigte, wurde der Mittelwert der Differenzen zwischen den einzelnen Fragebögen betrachtet und ein *t*-Test zwischen Kontrolle und Intervention durchgeführt.

2.7.4 Zeit im therapeutischen Bereich

Die Zeit im therapeutischen Bereich wurde nach der Methode nach Rosendahl (Rosendaal, Cannegieter et al. 1993) berechnet. Dazu wurden die Differenzen der INR-Werte zweier aufeinanderfolgender Messungen und die Differenz von dem INR-Wert der ersten Messung und der Grenze des therapeutischen Bereichs, der über- bzw. unterschritten wird, berechnet. Aus den beiden Differenzen wurde ein Quotient gebildet. Wenn man nun die Anzahl der Tage, die zwischen zwei Messungen liegen, mit diesem Prozentsatz multipliziert, erhält man die Anzahl der Tage, die der Patient im therapeutischen Bereich lag. Bleibt ein Patient zwischen zwei Messungen im therapeutischen Bereich, wird der Prozentsatz mit 100% angegeben, bleibt er innerhalb zweier Messungen außerhalb des therapeutischen Bereichs, wird der Prozentsatz mit 0% angegeben. Mit diesem Verfahren und allen Messungen wurde berechnet, an wie vielen Tagen der Patient im therapeutischen Bereich lag. Um zu sehen, ob eine Verbesserung aufgetreten ist, verglich man die Zeit im therapeutischen Bereich in den sechs Monaten vor Beginn der Studie mit der Zeit im therapeutischen Bereich während der Studie. Dazu wurde ein gemischtes lineares Model verwendet und anschließend ein Wald-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung der INR-Werte erfolgte durch die Medizinische Statistik der Georg-August-Universität Göttingen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Verwendete Wissensfragen

Wie lange muss ich voraussichtlich meinen Gerinnungshemmer einnehmen?

Richtige Antwort: *immer*.

Erklärung: Die Dauer der Einnahme von oralen Antikoagulantien hängt vom Nutzen-Risiko-Verhältnis der Einnahme ab. In der Regel finden orale Antikoagulantien vor allem Anwendung bei venösen Thromboembolien, Vorhofflimmern und mechanischen Herzklappen. Das chronische Vorhofflimmern ist die häufigste Indikation und bedeutet eine lebenslange Einnahme. Deshalb müssen die meisten Patienten ihren Gerinnungshemmer immer einnehmen (Camm, Kirchhof et al. 2010). Gerinnungshemmer, die nach einer Beinvenenthrombose oder auch Lungenembolie gegeben werden, werden in der Regel zwischen sechs Monate und einem Jahr verabreicht.

Wie häufig sollte die Blutgerinnung in der Regel kontrolliert werden?

Richtige Antwort: *alle 4 Wochen*.

Um die erforderliche Medikamentendosis zu ermitteln, ist eine regelmäßige Kontrolle der Blutgerinnung unerlässlich. Die Fachinformation zu Marcumar® empfiehlt eine regelmäßige Kontrolle der INR alle 3–4 Wochen, was routinemäßig in den meisten Hausarztpraxen der Fall ist. Treten Schwankungen auf, sollte häufiger gemessen werden (Hausärztliche Leitlinie, Kardiovaskuläre Prävention, DEGAM).

In welchem Bereich sollte mein Gerinnungswert liegen?

Je nach Indikation werden verschiedene INR-Bereiche (Tabelle 3) angestrebt (Camm, Kirchhof et al. 2010).

Tabelle 3: INR-Bereich

Indikation	INR-Bereich
Venöse Thromboembolien	2 bis 3
Vorhofflimmern	2 bis 3
Mechanische Herzklappen	2,5 bis 3,5
Mechanische Herzklappen + zusätzliches Risiko	3,5 bis 4,5

Welche Lebensmittel enthalten in üblicher Verzehrmenge viel Vitamin K?

Viele Lebensmittel enthalten viel Vitamin K. Diese Frage zielt auf die vermutlich am häufigsten verwendeten Lebensmittel der Patienten ab, nämlich *grünen Salat, Kohl, Spinat und Zwiebeln*.

Muss ich bei der Einnahme von Gerinnungshemmern eine spezielle Ernährungsvorschrift einhalten?

Richtige Antwort: *regelmäßig Salat und Gemüse*.

Vitamin-K-reiches Essen schwächt die Wirksamkeit von Phenprocoumon, da beide Substanzen um die Bindungsstelle an der Vitamin-K-Epoxidase konkurrieren. Klinische Studien bestätigen das (Franco, Polanczyk et al. 2004). Lange Zeit wurde daher Patienten mit oralen Antikoagulantien empfohlen, auf den Verzehr von Vitamin-K-reichen Lebensmitteln zu verzichten. Eine solche Diät ist schwierig zu befolgen und bedeutet für viele Patienten eine Einschränkung ihrer Lebensqualität. Neuere Studien belegen, dass Patienten, die regelmäßig gleiche Mengen Vitamin K zu sich nahmen, häufiger im INR-Zielbereich lagen als Patienten, die die Empfehlungen erhalten hatten, Vitamin K zu meiden. Neuere Studien zeigten jedoch, dass eine erhöhte Vitamin K-Aufnahme die Antikoagulation stabilisiert (Schurgers, Shearer et al. 2004; Sconce, Khan et al. 2005). Schurgers und Shearer berichten, dass bei einer Vitamin-K-reichen Ernährung sich die INR nur geringfügig verändert $1.97 (\pm 0.3)$ im Vergleich zu einer Vitamin-K-armen Ernährung $2.04 (\pm 0.3)$. Scone und Khan beschreiben, dass die durchschnittliche Vitamin-K-Aufnahme in Patienten mit nicht stabilen INR-Werten geringer war als in stabil eingestellten Patienten ($29 \pm 17 \mu\text{g}$ vs. $76 \pm 40 \mu\text{g}$); diese Studien wurden allerdings nur mit einer kleinen Probandenzahl durchgeführt und müssten für genauere Aussagen in größeren Gruppen überprüft werden. In der amerikanischen Leitlinie zur Antikoagulation wurde bei stark schwankenden INR-Werten die tägliche orale Substitution von 100 bis 200 μg Vitamin K pro Tag empfohlen (Ansell, Hirsh et al. 2008). Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt, keine besondere Ernährungsweise oder Diät einzuhalten. Es galten die Empfehlungen für eine abwechslungsreiche, vollwertige Ernährung. Auf Vitamin-K-reiche Lebensmittel sollte nicht verzichtet werden, da der Vitamin-K-Gehalt vernachlässigt werden kann. Eine extrem einseitige Kost ist jedoch zu vermeiden (Vitamin K und Ernährung mit Antikoagulantien, Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2001).

Welches freiverkäufliche Schmerzmittel ist bei Einnahme von Gerinnungshemmern (gemeint sind die oralen Antikoagulantien) am sichersten?

Richtige Antwort: *Paracetamol.*

Erklärung: Hemmstoffe der Cyclooxygenase 1, z. B. Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Diclofenac, erhöhen das gastrointestinale Blutungsrisiko. Sie können zu Magenschleimhautschädigungen mit Ulcusbildungen durch die verminderte Synthese von Prostaglandin E2 führen. Am stärksten und längsten von allen nichtsteroidalen Antirheumatika wirkt Acetylsalicylsäure, weil die Cyclooxygenase irreversibel acetyliert und inaktiviert wird. Des Weiteren verdrängt Acetylsalicylsäure orale Antikoagulantien aus ihrer Plasmaproteinbindung, was einer Wirkung der oralen Antikoagulantien verstärkt. Deshalb sollten antikoagulierte Patienten unbedingt auf Acetylsalicylsäure als Schmerzmittel verzichten. Als sicherstes Schmerzmittel für Patienten mit oraler Antikoagulation gilt Paracetamol; es gibt keine Hinweise, dass es mit Phenprocoumon interagiert (Wirth, Hürlimann et al. 2006). Ganz im Gegensatz zum Warfarin, bei dem eine Interaktion mit Paracetamol nachgewiesen werden konnte (Zhang, Bal-dit-Sollier et al. 2011).

Wie lange sollte ich eine vergessene Einnahme meines Gerinnungshemmers noch nachholen?

Richtige Antwort: *bis zu 12 Stunden.*

Erklärung: Wegen der geringen therapeutischen Breite von oralen Antikoagulantien muss der Patient sein Medikament regelmäßig einnehmen. Bislang gibt es aber keine Studien darüber, was zu tun ist, wenn der Patient die Einnahme vergisst. Hersteller und Experten empfehlen, die vergessene Einnahme von Phenprocoumon innerhalb von zwölf Stunden nachzuholen (Goldinger 2009). In einer Anwendungsbeobachtung (n=158) gaben 30,4% der Patienten an, dass sie eine vergessene Dosis mit der nächsten Einnahme nachholen (Al-Hajje, Calop et al. 2009). Da Phenprocoumon eine lange Halbwertszeit von 150 Stunden hat, erscheint dies sinnvoll. Die Plasmakonzentration ist 24 Stunden nach der Einnahme der doppelten Dosis nur geringfügig höher, als wenn die Einnahme nicht vergessen worden wäre, aber sie ist wesentlich niedriger, wenn die vergessene Einnahme nicht nachgeholt wird. Dieses Vorgehen wird jedoch nicht durch klinische Studien oder Empfehlungen in den Fachinformationen abgedeckt. Wir empfehlen die 12-Stunden-Regel nach Goldinger. Das heißt: Eine vergessene Dosis wird innerhalb von zwölf Stunden nachgeholt. Sollte die Dosis innerhalb dieses Zeitraums nicht eingenommen worden sein, lässt man sie aus und nimmt die nächste Dosis zum geplanten Zeitpunkt ein.

Woran merke ich, dass meine Blutgerinnung nicht ausreichend gehemmt ist?

Richtige Antwort: *Das merke ich praktisch nicht.*

Erklärung: Dies ist ein besonderes Problem der Therapie mit oralen Antikoagulantien. Die Patienten merken eine ungenügende Antikoagulation erst beim Auftreten von Komplikationen und vorher gar nicht. Deshalb sind regelmäßige INR-Kontrollen unabdingbar.

Was kann die Wirkung der Gerinnungshemmer wesentlich beeinflussen?

Richtige Antworten: *Magen-Darm-Infekt, Fieber, Ginkgo, Fastendiät, freiverkäufliche Medikamente.*

Erklärung: Die Blutgerinnung hängt von vielen Faktoren ab. Und so sind auch verschiedene Interaktionen möglich, die somit auch die orale Antikoagulation beeinflussen. Neben Medikamenten können akute Erkrankungen die Blutgerinnung bei Einnahme von Phenprocoumon stark beeinflussen. Fieber führt zu einem beschleunigten Abbau der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, was ein verstärktes Ansprechen auf orale Antikoagulantien bewirkt. Ein Magen-Darm-Infekt kann die Aufnahme von Vitamin K in den Körper vermindern und damit die blutverdünnende Wirkung von Phenprocoumon fördern. Auch Alkohol kann die Blutgerinnung beeinflussen: Eine einmalige Aufnahme größerer Mengen verstärkt die Wirkung von Phenprocoumon, da Phenprocoumon und Alkohol über die Leber abgebaut werden und nun Phenprocoumon nicht mehr so schnell abgebaut werden kann. Ein chronischer Alkoholismus kann zu einer Leberschädigung und einem verlangsamten Abbau von Phenprocoumon führen. Das heißt aber nicht, dass auf Alkohol verzichtet werden muss. Gegen einen mäßigen Alkoholkonsum ist nichts einzuwenden (Hausärztlicher Leitlinie, Kardiovaskuläre Prävention, DEGAM).

Auch bestimmte pflanzliche Sekundärstoffe können die Einnahme von oralen Antikoagulantien beeinflussen. Es ist beobachtet worden, dass Ginkgoblattextrakte (*Ginkgo biloba*) die Antikoagulation verstärken können (Bent, Goldberg et al. 2005). Auch wenn andere Studien dies nicht bestätigen, sollte ein Einfluss von Ginkgo bedacht werden (Bone 2008). Daher sollten Anwender von oralen Antikoagulantien Ginkgopräparate meiden.

In welchen Situationen sollte ich am selben Tag noch eine Ärztin/einen Arzt kontaktieren?

Richtige Antworten: *bei schmerzhaften Schwellungen mit und ohne Verfärbung der Haut; Schwäche im Arm, auch vorübergehend, plötzliche Sprachstörung, schwarzer Stuhlgang* (Leitlinie, Antikoagulation mit Phenprocoumon, Herzklinikum Ulm).

- Schwarzer Stuhlgang kann auf Darmblutungen hinweisen.
- Schmerzhaftes Schwellungen mit und ohne Verfärbung können auf innere Blutungen hinweisen.
- Plötzliche Sprachstörungen oder eine Schwäche in den Armen sind Hinweise auf einen Schlaganfall.

Wann sollte ich darauf hinweisen, dass ich einen Gerinnungshemmer einnehme?

Richtige Antworten: *beim Zahnarztbesuch, bei Neuverordnung von Medikamenten, in der Apotheke, vor geplanten Operationen, vor einer Injektion* (Hausärztlicher Leitlinie, Kardiovaskuläre Prävention, DEGAM).

Der Zahnarzt muss vor einer Behandlung auf die Einnahme von Phenprocoumon hingewiesen werden. Auch der Apotheker sollte Bescheid wissen, um abgleichen zu können, ob neu verordnete Medikamente zu Wechselwirkungen mit Phenprocoumon führen können. Vor Injektionen und vor jeder Operation sollte auf die Einnahme von Phenprocoumon hingewiesen werden, damit die Behandelnden wissen, dass durch die Gerinnungshemmung eine erhöhte Blutungsneigung besteht. In bestimmten Fällen kann es sinnvoll sein, kurzzeitig die Dosis von Phenprocoumon zu reduzieren, es abzusetzen oder vorübergehend einen anderen Gerinnungshemmer zu verwenden. Dies muss jedoch der jeweilige Arzt entscheiden. Auch Angehörige und Verwandte sollten von der Einnahme von Phenprocoumon in Kenntnis gesetzt werden.

3.2 Rekrutierungsverlauf

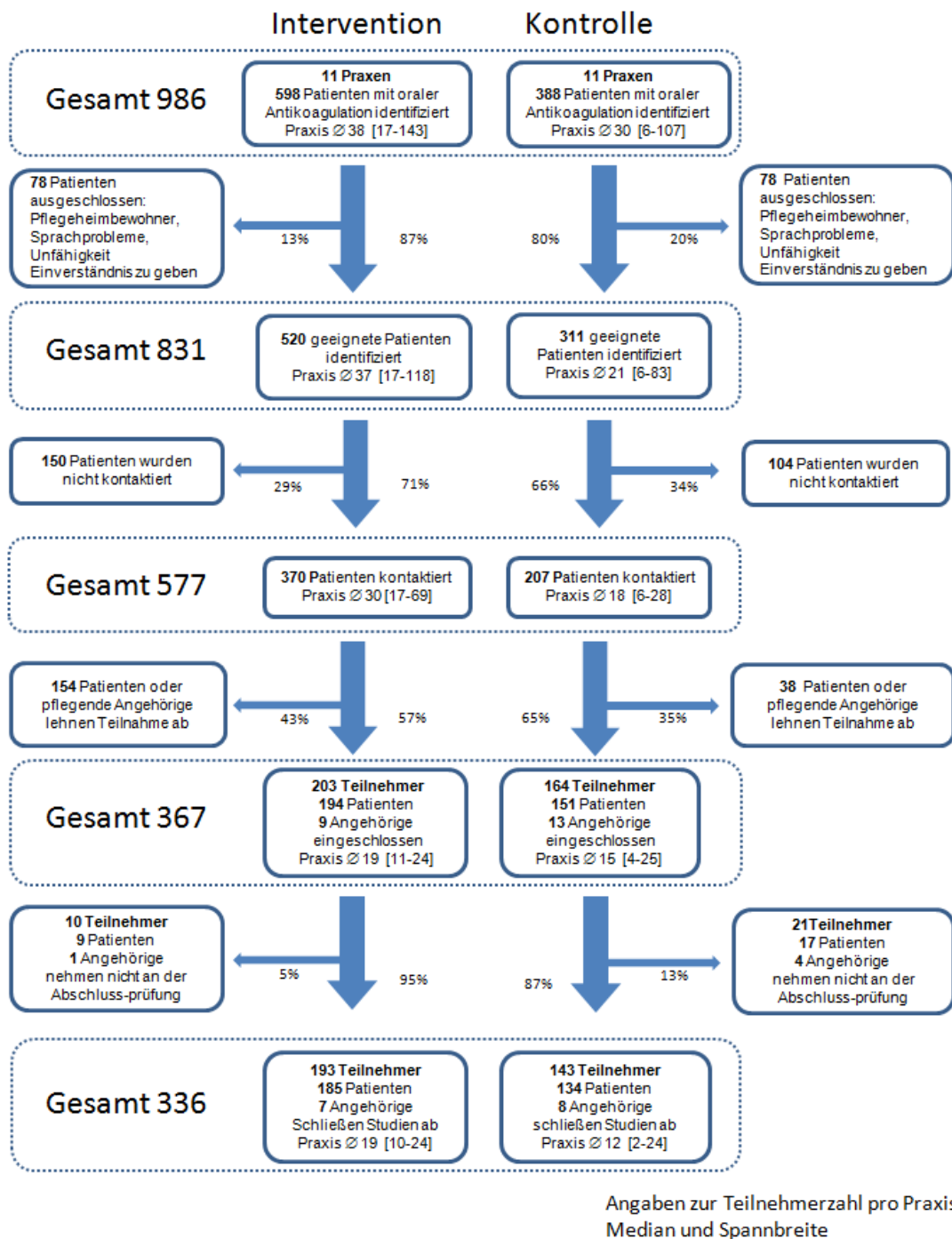


Abbildung 2: Übersicht aller Teilnehmer nach Studienarm

In Abbildung 2 ist der Rekrutierungsverlauf der Studienteilnehmer dargestellt. Insgesamt nahmen 22 Praxen an der Studie teil, was zu einer Gesamtzahl von 986 potenziellen Teilnehmern (Angehörige eingeschlossen) führte. Die Praxen wurden gleich zu Beginn in Kontroll-

und Interventionspraxen randomisiert. Aufgrund von Nichterfüllen der Einschlusskriterien, Nichtansprechen von Patienten oder Teilnahmeablehnung blieben 367 Patienten übrig, die bereit waren, an der Studie teilzunehmen. Von diesen Patienten nahmen 31 nicht an der Abschlussuntersuchung teil, was zu einer Gesamtteilnehmerzahl von 336 Patienten führte. Insgesamt ergaben sich daraus 193 Teilnehmer in der Interventionsgruppe (185 Patienten, sieben Angehörige) und 143 Teilnehmer in der Kontrollgruppe (134 Patienten, acht Angehörige). Bei der Auswertung werden nur Patienten und Angehörige berücksichtigt, die die Studie „per protocol“ abgeschlossen haben.

3.3 Ergebnisse für Patienten

Im diesem Kapitel werden nur die Patienten ausgewertet. In Kapitel 3.4 soll in einer vereinfachten Form auf die Angehörigen eingegangen werden.

3.3.1 Soziodemographische Daten

Tabelle 4: Soziodemographische Daten der Patienten

		Kontrolle n=134 (%)	Intervention n=185 (%)
Geschlecht	Weiblich	47,8	46,5
	Männlich	52,2	53,5
Alter	Mittelwert	72,3	73,1
	Median	74,5	75,0
	Minimum	41,0	24,0
	Maximum	90,0	90,0
Schulabschluss	Hauptschule/Volksschule	64,9	77,8
	Realschule/Polytechnische OS	17,9	11,4
	Fachhochschulreife	6,0	3,2
	Hochschulreife/Abitur	7,5	3,2
	anderer Schulabschluss	1,5	2,7

	kein Schulabschluss	1,5	1,6
Berufsausbildung	Lehre (berufliche/betriebliche Ausbildung)	58,2	48,1
	Fachschule (Meister-, Techniker-, Berufsakademie)	11,9	15,7
	Fachhochschule	3,7	2,7
	Universität/Hochschule	5,2	1,1
	andere Berufsausbildung	2,2	4,3
	keine Berufsausbildung	14,9	24,9
Erwerbstätigkeit	ganztags/Vollzeit	6,7	3,8
	mindestens Halbtags/Teilzeit	1,5	0,5
	Ausbildung/Lehre/Weiterbildung/Umschulung	0,0	0,5
	Altersrente	82,8	84,9
	Altersteilzeit	0,7	2,2
	Hausfrau/Hausmann	4,5	3,8
	arbeitslos/erwerbslos	1,5	1,6
	Sonstiges	2,2	1,6

Die in Tabelle 4 dargestellten soziodemographischen Daten weisen für beide Gruppen keine erheblichen Unterschiede in den erfassten Daten zwischen der Interventions- und Kontrollgruppe auf. Der Großteil der Patienten ist über 65 Jahre alt. Die meisten Patienten haben eine Schulausbildung von weniger als 10 Jahren genossen. Damit ergibt sich auch bei der Berufsausbildung mehrheitlich eine abgeschlossene Lehre. Der Großteil der Patienten (>80%) befindet sich bereits in der Altersrente, und nur wenige Patienten sind noch berufstätig.

Tabelle 5: Indikation für die Einnahme von oralen Antikoagulantien

		Gesamt (%)	Kontrolle (%)	Intervention (%)	p-Wert [■]
Indikation laut Patient (Baseline)	Herzrhythmusstörung	69,6	60,4	76,2	,007**
	Beinvenenthrombose	19,7	16,4	22,2	,236
	Lungenembolie	10,0	9,0	10,8	,638
	künstliche Gefäßprothese	5,0	6,7	3,8	,240
	künstliche Herzklappe(n)	6,6	8,2	5,4	,309
	weiß ich nicht	4,4	9,7	0,5	,001**
Indikation laut medizinische Fachangestellte	Vorhofflimmern	56,4	61,2	53,0	,068*
	Beinvenenthrombose	17,9	11,2	22,7	,006**
	Lungenembolie	11,6	8,3	14,1	,097
	künstliche Gefäßprothese	1,3	2,2	0,5	,224
	künstliche Herzklappe(n)	6,6	9,0	4,9	,164
	Andere	21,3	24,6	18,9	,243

In Tabelle 5 sind die einzelnen Indikationen für die Einnahme der oralen Antikoagulation dargestellt. Zwei unterschiedliche Quellen wurden verwendet. Zum einen wurde der Patient im Fragebogen nach der Indikation gefragt, zum anderen bat man die medizinischen Fachangestellten, auf einem separaten Zettel die Indikation, wenn diese bekannt sein sollte, zu notieren. In beiden Fällen waren Mehrfachnennungen möglich, sodass sich eine Gesamtzahl von mehr als 100% ergibt.

Der Großteil der Patienten leidet unter Herzrhythmus-Störungen, bei denen es sich hauptsächlich um Vorhofflimmern handelt. Fast 30% nehmen die oralen Antikoagulantien aufgrund von Thrombosen, ein geringer Prozentsatz aufgrund von künstlichen Gefäßen bzw. Herzklappen.

■ t-Test Kontrolle gegen Intervention, Signifikanzlevel: *** für $p < .001$; ** für $p < .01$; * für $p < .05$

3.3.2 Wissensfragen

Tabelle 6: Auswertung der Wissensfragen für Baseline und Abschluss

Wissen	Baseline (Bei Studienbeginn)			Abschluss (nach 6 Monaten)			Vorher-Nachher-Vergleich zwischen Gruppen ¹
	Kontrolle Richtig	Intervention Richtig	<i>p</i> -Wert ²	Kontrolle Richtig	Intervention Richtig	<i>p</i> -Wert ²	
Einnahmedauer	56,0%	63,2%	,190	68,7%	85,9%	<0,001***	<0,001***
Kontrollfrequenz	87,3%	78,4%	,040*	88,8%	93,0%	,194	<0,001***
INR-Zielbereich	57,4%	60,8%	,555	75,4%	86,0%	,018*	<0,001***
Ernährungsvorschrift	33,6%	30,3%	,530	42,5%	69,2%	<0,001***	<0,001***
Sicherstes Schmerzmittel	21,6%	19,5%	,633	26,9%	63,8%	<0,001***	<0,001***
Vorgehen bei vergessener Einnahme	13,4%	13,5%	,983	16,4%	56,8%	<0,001***	0,012*
Wissen, dass ausreichende Antikoagulation nicht erkannt wird	59,0%	56,8%	,695	67,2%	82,7%	,001**	<0,001***
Vitamin-K-reiche Lebensmittel							
• Kohl	76,2%	83,8%	,114	78,5%	94,6%	<0,001***	<0,001***
• Grüner Salat	41,0%	58,1%	,004**	55,0%	75,0%	<0,001***	<0,001***
• Spinat	52,5%	55,0%	,671	53,3%	72,8%	<0,001***	<0,001***
• Zwiebeln	9,0%	14,4%	,171	14,2%	47,8%	<0,001***	0,817
Einflussfaktoren der oralen Antikoagulantien							
• Gastrointestinale Erkrankungen	21,5%	15,3%	,156	24,4%	50,0%	<0,001***	<0,001***

• Fieber	6,2%	3,8%	,342	14,5%	33,7%	<0,001***	0,105
• Ginkgo	3,8%	5,5%	,509	6,1%	16,8%	,004**	<0,001***
• Fastendiät	16,9%	13,1%	,348	17,6%	28,3%	,028*	<0,001***
• Freiverkäufliche Medikamente	23,1%	18,6%	,331	25,2%	38,0%	,017*	<0,001***
Erkennen von Notfallsituationen							
• Schmerzhafte Hautschwellungen	23,7%	30,4%	,190	34,8%	56,2%	<0,001***	<0,001***
• Plötzliche Sprachprobleme	47,3%	52,5%	,368	53,0%	76,2%	<0,001***	<0,001***
• Schwarzer Stuhl	35,1%	40,9%	,301	55,3%	79,5%	<0,001***	<0,001***
• Armschwäche	22,9%	26,0%	,535	35,6%	50,8%	,007**	<0,001***
Hinweis auf Einnahme von oralen Antikoagulantien							
• Zahnarzt	91,7%	90,2%	,660	87,3%	96,8%	,001**	<0,001***
• Apotheker	26,5%	27,7%	,813	21,6%	52,4%	<0,001***	<0,001***
• Vor einer Injektion	44,7%	43,5%	,830	40,3%	63,8%	<0,001***	<0,001***
• Bei Verschreibung neuer Medikamente	55,3%	54,3%	,866	52,2%	64,3%	,030*	<0,001***
• Vor einer Operation	91,7%	87,0%	,188	88,1%	90,3%	,528	<0,001***

■¹ Cochran-Mantel-Haenszel-Test mit Studienarm als Kontrolle

■² Chiquadrat-Test

Signifikanzlevel: *** für p < .001; ** für p < .01; * für p < .05

In Tabelle 6 sind die Häufigkeiten der richtigen Antworten in Prozent für die Kontroll- und die Interventionsgruppe sowohl zu Studienbeginn (Baseline) als auch nach sechs Monaten (Abschluss) dargestellt. Es lässt sich ein deutlicher Wissenszuwachs beim Vergleich zwischen Intervention und Kontrolle zugunsten der Interventionsgruppe für nahezu alle Fragen nach sechs Monaten erkennen. Schaut man sich den p-Wert zu Beginn der Studie zum Vergleich zwischen Kontrolle und Intervention an, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen für fast alle Fragen erkennen. Nach sechs Monaten ist der Unterschied für fast alle Fragen signifikant. Betrachtet man den p-Wert des Cochran-Mantel-Haenszel-Tests für die Fragen, in denen sich schon zu Beginn der Studie eine Signifikanz erkennen ließ und nun keine Aussage über Unterschiede anhand des Chi-Quadrat-Tests gemacht werden kann, sieht man auch hier einen deutlichen signifikanten Unterschied. Dieser Fall trifft für die Frage nach der Kontrollfrequenz (Häufigkeit der INR-Messungen) und dem Vitamin-K-Gehalt von grünem Salat zu. Betrachtet man nur die Ergebnisse des Cochran-Mantel-Haenszel-Tests, lässt sich in fast allen Bereichen ein starker Effekt erkennen. Für die Frage nach dem Vitamin-K-Gehalt von Zwiebeln gab es keine Verbesserung. Und der Einfluss von Fieber wurde in der Interventionsgruppe nach der Schulung nicht merklich besser erkannt.

Tabelle 7: Vorher-Nachher-Vergleich (Baseline, Zwischenerhebung, Abschluss)

	Baseline (1)	Zwischenerhebung (2)	Abschluss (3)	Vorher-Nachher- Vergleich zwischen 1 und 2 ^{■1}	Vorher-Nachher- Vergleich zwischen 2 und 3 ^{■2}
Einnahmedauer	0,632	0,832	0,859	<0,001 ***	0,276
Kontrollfrequenz	0,784	0,951	0,930	<0,001 ***	0,347
INR-Zielbereich	0,392	0,073	0,140	<0,001 ***	0,004 **
Ernährungsvorschrift	0,303	0,789	0,692	<0,001 ***	0,005 **
Sicherstes Schmerzmittel	0,195	0,762	0,638	<0,001 ***	0,001 **
Vorgehen bei vergessener Einnahme	0,135	0,719	0,568	<0,001 ***	<0,001 ***
Wissen, dass ausreichende Antikoagulation nicht erkannt wird	0,568	0,843	0,827	<0,001 ***	0,623
Vitamin-K-reiche Lebensmittel					
• Kohl	0,838	0,962	0,946	<0,001 ***	0,594
• Grüner Salat	0,581	0,836	0,750	<0,001 ***	0,022 *
• Spinat	0,550	0,849	0,728	<0,001 ***	0,005 **
• Zwiebeln	0,144	0,723	0,478	<0,001 ***	<0,001 ***
Einflussfaktoren der oralen Antikoagulation					
• Gastrointestinale Erkrankungen	0,153	0,577	0,500	<0,001 ***	0,075
• Fieber	0,038	0,467	0,337	<0,001 ***	0,004 **
• Ginkgo	0,055	0,280	0,168	<0,001 ***	0,003 **

• Fastendiät	0,131	0,418	0,283	<0,001 ***	0,001 **
• Freiverkäufliche Medikamente	0,186	0,495	0,380	<0,001 ***	0,015 *
Erkennen von Notfallsituationen					
• Schmerzhafte Hautschwellungen	0,304	0,729	0,562	<0,001 ***	<0,001 ***
• Plötzliche Sprachprobleme	0,525	0,817	0,762	<0,001 ***	0,114
• Schwarzer Stuhl	0,409	0,867	0,795	<0,001 ***	0,023 *
• Armschwäche	0,260	0,630	0,508	<0,001 ***	0,006 **
Hinweis auf Einnahme von oralen Antikoagulantien					
• Zahnarzt	0,902	1,000	0,968	<0,001 ***	0,014 *
• Apotheker	0,277	0,723	0,524	<0,001 ***	<0,001 ***
• Vor einer Injektion	0,435	0,761	0,638	<0,001 ***	0,001 **
• Bei Verschreibung neuer Medikamente	0,543	0,690	0,643	0,001 **	0,239
• Vor einer OP	0,870	0,978	0,903	<0,001 ***	0,002 **

■¹ t-Test

■² t-Test

Signifikanzlevel: *** für $p < .001$; ** für $p < .01$; * für $p < .05$

In Tabelle 7 sind die Häufigkeiten der richtigen Antworten für die Wissensfragen für alle drei Fragebögen in der Interventionsgruppe dargestellt. Außerdem werden Baseline und Zwischenerhebung und Zwischenerhebung und Abschluss mittels *t*-Tests miteinander verglichen. Es ist klar erkennbar: Während zu Beginn der Studie das Wissen eher gering war, steigt es bei der Zwischenerhebung sehr stark. In Bezug auf fast alle Fragen lässt sich ein signifikanter Unterschied feststellen. Betrachtet man nun den Abschlussfragebogen, lässt sich nur eine geringe Änderung im Vergleich zur Zwischenerhebung erkennen. Schaut man sich die *p*-Werte an, lässt sich in vielen Fällen kein signifikanter Unterschied erkennen, was darauf hindeutet, dass das Wissen auch über die sechs Monate vorhanden blieb. Jedoch weisen einige Fragen einen Unterschied auf, der beim Betrachten der Häufigkeiten zeigt, dass einige Patienten insbesondere in Bezug auf die Einflussfaktoren ihr erlerntes Wissen wieder verloren haben. Dieser Aspekt soll später ausführlicher diskutiert werden.

3.3.3 Subjektives Sicherheitsempfinden zwischen Fragebogen Baseline und Abschluss

Tabelle 8: Subjektives Sicherheitsempfinden

		Bei Studienbeginn (Fragebogen 1)			Nach 6 Monaten (Fragebogen 3)			Differenz der Mittelwerte aus Fragebogen 1 und 3			Anmerkung zur Richtung
		Kontrolle	Intervention	p-Wert ¹	Kontrolle	Intervention	p-Wert ²	Kontrolle	Intervention	p-Wert ³	
Wissenseinschätzung über orale Antikoagulantien	sehr gut	11,2%	7,6%	0,051	9,0%	6,5%	0,849	-,205	-,379	,055	negativ = Verbesserung
	gut	51,5%	44,9%		73,1%	77,8%					
	mittelmäßig	32,1%	39,5%		15,7%	15,1%					
	unzureichend	4,5%	7,0%		1,5%	0,0%					
	Mittelwert	2,3	2,5		2,1	2,1					
Beeinträchtigung der Lebensqualität	stimme zu	14,9%	15,7%	0,621	15,7%	4,3%	,012	-,070	,232	,014*	positiv= Verbesserung
	stimme eher zu	15,7%	17,8%		20,1%	19,5%					
	stimme eher nicht zu	31,3%	32,4%		34,3%	42,2%					
	stimme nicht zu	34,3%	31,9%		29,9%	34,1%					
	Mittelwert	2,9	2,8		2,8	3,1					
Angst vor Gerinn- selbildung	stimme zu	19,4%	28,6%	0,327	33,6%	25,9%	,136	-,165	,094	,065	positiv= Verbesserung
	stimme eher zu	28,4%	24,9%		20,1%	23,8%					
	stimme eher nicht zu	26,1%	22,2%		28,4%	24,9%					
	stimme nicht zu	20,9%	22,2%		17,9%	25,4%					

Mittelwert		2,5	2,4		2,3	2,5				
Angst vor Blutungen	stimme zu	21,6%	35,1%		24,6%	24,9%				
	stimme eher zu	23,9%	21,6%		26,9%	25,4%				
	stimme eher nicht zu	27,6%	23,2%	0,015*	31,3%	26,5%	,420	-,180	0,210	0,002**
	stimme nicht zu	24,6%	18,4%		14,9%	22,7%				
	Mittelwert	2,6	2,3		2,4	2,5				

positiv=
Verbesserung

- ¹ *t*-Test für die Mittelwerte zwischen Kontrolle und Intervention
 - ² *t*-Test für die Mittelwerte zwischen Kontrolle und Intervention
 - ³ *t*-Test für die Differenzen der Mittelwerte zwischen Kontrolle und Intervention
- Signifikanzlevel: *** für $p < .001$; ** für $p < .01$; * für $p < .05$

In der Tabelle 8 sind die Häufigkeiten der Antworten zum subjektiven Sicherheitsempfinden in Prozent dargestellt und die daraus berechneten Mittelwerte, wobei die oberste Wertung einer 1 entspricht und die unterste Wertung einer 4. Tabelle 8 und Abbildung 3 zeigen, dass sich das subjektive Sicherheitsempfinden in der Interventionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nach sechs Monaten verbessert hat. Zwar lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe bei Betrachtung des Abschluss-Fragebogens erkennen. Betrachtet man jedoch die Differenzen der Mittelwerte, kann man eine Verbesserung erkennen. Geht es um die Wissenseneinschätzung und die Angst vor einer Gerinnselbildung, kann man zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe eine Tendenz zugunsten der Interventionsgruppe ausmachen. Für die Beeinträchtigung der Lebensqualität lässt sich ein Effekt erkennen. Während es beim Betrachten der Mittelwerte zu einer Verschlechterung in der Kontrollgruppe kam, war in der Interventionsgruppe eine Verbesserung erkennbar. Auch die Angst vor Blutungen nimmt in der Interventionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ab, während in der Kontrollgruppe wieder eine Verschlechterung auftritt.

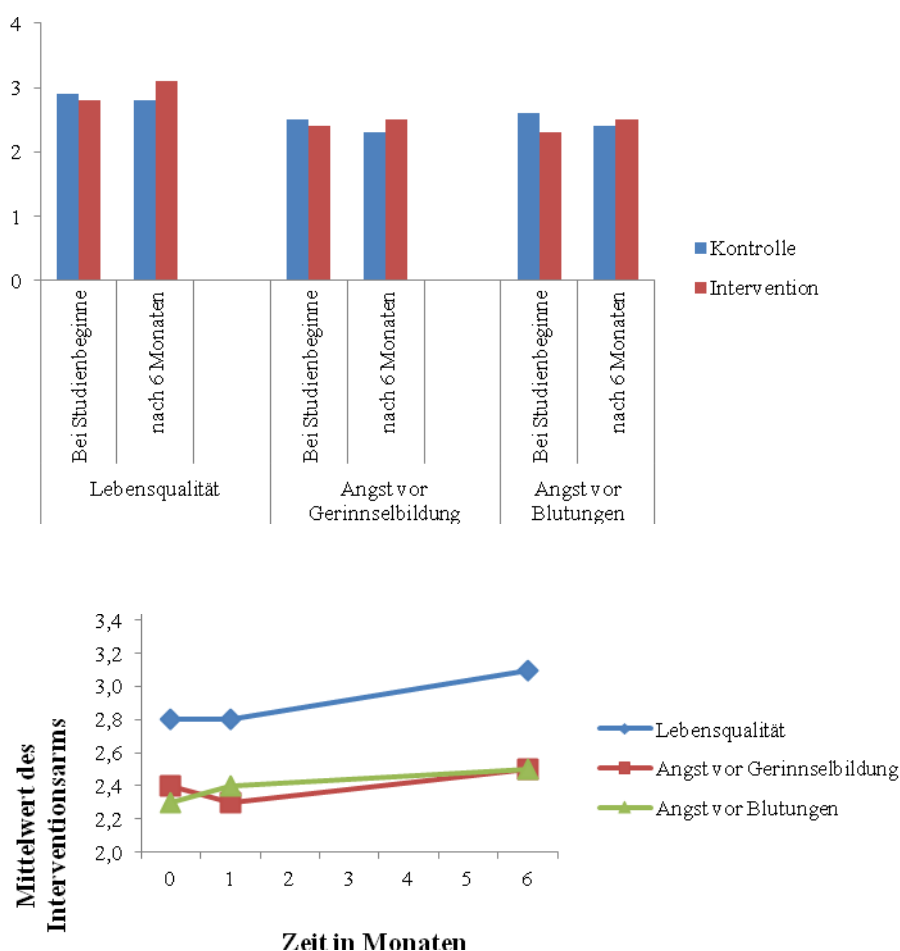


Abbildung 3: Subjektives Sicherheitsempfinden

3.3.4 Zeit im therapeutischen Bereich

Die Daten von n = 259 Patienten wurden verwendet, um das gemischte lineare Modell zu berechnen.

Tabelle 9: Zusammenfassung des gemischten linearen Modells zu der Zeit im therapeutischen Bereich

	Schätzwert	95% CI	p-Wert
Adjustierte Gruppendifferenz	0,072	[-0,01; 0,15]	0,09
Varianzkomponentenmodell	0,0037	[-0,002; 0,09]	Ns

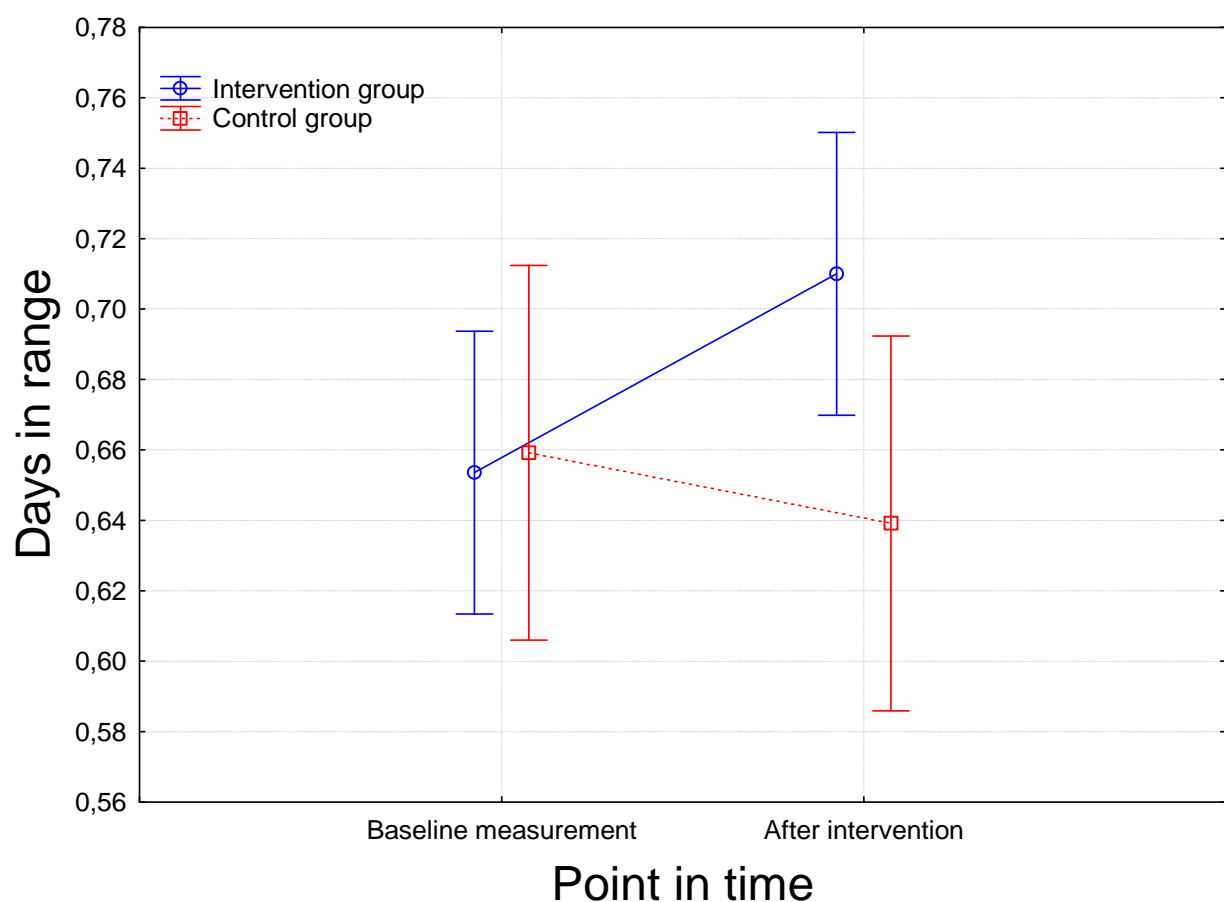


Abbildung 4 : Zeit im therapeutischen Bereich

Tabelle 9 und Abbildung 4 zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Interventions- und Kontrollgruppe bezüglich der Zeit im therapeutischen Bereich innerhalb der Zeit von Beginn (Baseline-Fragebogen) bis Ende (Abschluss-Fragebogen) der Studie gibt. Es ist jedoch erkennbar, dass es eine Tendenz zugunsten der Interventionsgruppe gibt. Hier

konnte sich die Zeit im therapeutischen Bereich verlängern. In der Kontrollgruppe hingegen kam es zu einer leichten Verschlechterung. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant sind, so lässt der p-Wert von 0,09 eine klare Tendenz erkennen.

3.3.5 Auftreten von Komplikationen

Abschließend wurde im Abschlussfragebogen die Frage nach aufgetretenen Komplikationen innerhalb der letzten sechs Monate gestellt. Dabei ergab sich folgende Verteilung:

Tabelle 10: Aufgetretene Komplikationen während der Studie

	Kontrolle (%)	Intervention (%)	p-Wert [■]
Keine	82,8	87,6	0,311
Nasenbluten	4,5	4,9	0,884
Darmblutungen	0,7	0,0	0,320
Blutergüsse	10,4	7,6	0,360
Thrombose	0,0	1,1	0,158
Andere	0,0	0,5	0,397
Weiß ich nicht	5,2	0,5	0,021 *
Gesamt			
(Summe aller auf Störungen der Blugerinnung beruhenden Ereignisse)	15,7	14,1	0,701

Vergleicht man die Häufigkeiten der auftretenden Komplikationen, so ist erkennbar, dass innerhalb der Studie mehr Komplikationen aufgetreten sind als vor der Studie. Außerdem zeigt sich, dass es nach der Studie keinen deutlichen Unterschied zwischen dem Auftreten von Komplikationen in der Interventions- und Kontrollgruppe gibt. Insgesamt war die Dauer der Studie und Komplikationsrate zu gering, um eindeutige Effekte nachweisen zu können. Dieser Aspekt soll später diskutiert werden.

■¹ t-Test Vergleich zwischen Kontrolle und Intervention
Signifikanzlevel: *** für $p < .001$; ** für $p < .01$; * für $p < .05$

3.3.6 Abschließende Bewertungsfragen im Abschlussfragebogen

Tabelle 11: Bewertungsfragebogen

		Kontrolle (%)	Intervention (%)	p-Wert [■]
Sollten Patienten mit oraler Antikoagulation an einem Schulungsprogramm teilnehmen	Ja	56,0	86,5	---
	Nein	11,9	3,8	---
	weiß ich nicht	30,6	7,6	---
Wo sollte die Schulung stattfinden	Krankenhaus	19,1	4,5	,000
	Hausarztpraxis	82,7	96,1	,001
	Krankenkasse	6,4	2,3	,115
Elemente der Schulung: Broschüre	stimme zu	42,5	68,1	---
	stimme eher zu	3,7	6,5	---
	stimme eher nicht	1,5	1,1	---
	stimme nicht zu	8,2	2,2	---
	Mittelwert	1,6	1,2	,008
Elemente der Schulung: Video	stimme zu	12,7	62,7	---
	stimme eher zu	5,2	8,6	---
	stimme eher nicht	6,7	3,2	---
	stimme nicht zu	14,9	1,1	---
	Mittelwert	2,6	1,2	,000
Elemente der Schulung: persönliche Beratung	stimme zu	68,7	83,8	---
	stimme eher zu	9,0	5,9	---
	stimme eher nicht		0,5	---
	stimme nicht zu	3,0	1,1	---
	Mittelwert	1,2	1,1	,114

■ t-Test zwischen Kontrolle und Intervention

Wie Tabelle 11: Bewertungsfragebogen zeigt ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Interventions- und Kontrollgruppe zu sehen. Sowohl Kontrolle als auch Intervention möchten keine Schulung im Krankenhaus, sondern präferieren eine Schulung in der Hausarztpraxis, wobei dieser Unterschied in der Interventionsgruppe noch deutlicher ist. Fragt man nach Elementen der Schulung, lässt sich erkennen, dass sich ein Großteil der Patienten eine Schulung bestehend aus Broschüre, Video und persönlicher Schulung wünscht, wobei der Wunsch nach einer persönlichen Schulung für beide Gruppen am deutlichsten ist. Jedoch ist hier der Unterschied nicht signifikant. Es lässt sich aus der Frage nicht herauslesen, ob mit einer persönlichen Schulung die Schulung beim Hausarzt oder mit einer medizinischen Fachangestellten ausreicht. Betrachtet man nun die Frage nach dem Video, ist ganz klar erkennbar, dass die Interventionsgruppe das Video im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr stark annimmt. Es lässt sich aber klar sagen, dass die Patienten eine Schulung in einer Hausarztpraxis bestehend aus allen drei Elementen bevorzugen. Fakt ist, dass der Großteil der Patienten eine Schulung für wichtig und notwendig bei Therapie mit oralen Antikoagulantien betrachtet.

3.3.7 Aus allen Wissensfragen ermittelter Gesamtscore

Insgesamt konnte ein Gesamtscore von 27 Punkten erreicht werden. Durch den Abzug von Punkten bei Falschantwort in Bezug auf Gemüsefragen (s. Methode) ergibt sich eine Mindestpunktzahl von -3 Punkten.

Tabelle 12: Gesamtscore

		Baseline (1)	Zwischenerhebung (2)	Abschluss (3)	t-Test zwischen 1 und 3	t-Test zwischen 1 und 2	t-Test zwischen 2 und 3	Differenz zwischen 1 und 3
Kontrolle	Mittelwert	6,3	---	7,9	<0,001***	---	---	1,6
	Median	6,0	---	7,0				1,0
	Standardabweichung	3,2	---	5,7				4,4
	Varianz	10,1	---	32,8				19,0
	Minimum	0,0	---	-5,0				-8,0
	Maximum	14,0	---	24,0				15,0
Intervention	Mittelwert	6,2	16,7	14,2	<0,001***	<0,001***	<0,001***	7,9
	Median	6,0	17,0	15,0				8,0
	Standardabweichung	3,5	5,2	5,8				5,8
	Varianz	12,0	26,9	33,6				33,1
	Minimum	0,0	0,0	-1,0				-8,0
	Maximum	18,0	26,0	25,0				22,0
t-Test zwischen Kontrolle und Intervention		0,893	---	<0,001***	---	---	---	<0,001***

■¹ t-Test Vergleich zwischen Kontrolle und Intervention

Signifikanzlevel: *** für p < .001; ** für p < .01; * für p < .05

Tabelle 12 zeigt, dass es zu Beginn der Studie zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe keinen signifikanten Unterschied gab, während es nach sechs Monaten einen solchen gab. Das Wissen der Patientengruppe hat sich hochsignifikant verbessert. Auch der Baseline-Fragebogen zur Zwischenerhebung lässt dies in noch größerem Ausmaß erkennen. Von der Zwischenerhebung bis zum Abschluss gibt es eine Verschlechterung in der Interventionsgruppe, die auch signifikant ist, jedoch beim Betrachten der Punktzahl nicht ausschlaggebend ist. Auch die Differenzen des Gesamtscore zwischen Baseline und Abschluss zeigen für die Interventionsgruppe einen signifikanten Unterschied auf, während es innerhalb der Kontrollgruppe keine nachweisbaren Unterschiede gibt. Insgesamt hat die Interventionsgruppe einen Wissenszuwachs von acht Punkten, während der in der Kontrollgruppe bei nur einem Punkt liegt.

3.3.8 Regressionsanalysen

Tabelle 13: Regressionsanalyse

		Wissenseinschätzung	Alter	Schuljahre	Geschlecht
Alle	korrigiertes R^2	0,019	0,084	< 0,001	-0,002
	Regressionskoeffizient	-0,674	-0,102	0,163	-0,188
	p-Wert	0,008	<0,001	0,349	0,617
Kontrolle	korrigiertes R^2	0,048	0,135	0,001	-0,003
	Regressionskoeffizient	-1,024	-0,124	0,238	-0,414
	p-Wert	0,006	<0,001	0,291	0,454
Intervention	korrigiertes R^2	0,003	0,054	-0,006	-0,005
	Regressionskoeffizient	-0,432	-0,086	0,030	-0,022
	p-Wert	0,209	0,001	0,914	0,966

Für die Tabelle 13 wurde eine Regression nach der Einschluss-Methode für mögliche Einflussfaktoren auf den Gesamtscore durchgeführt, wobei die einzelnen Einflussfaktoren separat

betrachtet wurden. Dargestellt ist die Regression für alle Patienten und nur in Bezug auf die einzelnen Gruppen. Es lässt sich erkennen, dass weder Geschlecht noch Anzahl an Schuljahren einen signifikanten Einfluss auf den Gesamtscore haben. Das Alter hingegen zeigt einen Einfluss zugunsten der jüngeren Patienten. Diese Aussage lässt sich nicht nur insgesamt, sondern auch für beide Gruppen erkennen. Betrachtet man die Wissenseneinschätzung der Patienten, lässt sich auch hier ein Zusammenhang erkennen. Je besser die Patienten ihr Wissen einschätzen, umso höher ist ihr Gesamtscore.

Tabelle 14: Regressionsanalyse für Gesamtscore in Fragebogen 3, nur Intervention

	Wissenseinschätzung	Alter	Schuljahre	Geschlecht
korrigiertes R^2	0,012	0,017	-0,004	<0,001
Regressionskoeffizient	1,023	-0,088	0,248	-0,827
p-Wert	0,079	0,044*	0,605	0,335

Auch für den Gesamtscore im Abschlussfragebogen lassen sich dieselben Ergebnisse wie für den Gesamtscore in Baseline erkennen. Das Alter hat einen Einfluss auf den Gesamtscore zugunsten der jüngeren Patienten, während das Geschlecht und die Anzahl der Schuljahre keinen Einfluss haben. Interessanterweise steigt der Score mit schlechterer Wissenseneinschätzung (Tabelle 14).

Tabelle 15: Einfluss der Gruppe auf den Gesamtscore

	Gruppe
korrigiertes R^2	-0,003
Gesamtscore Baseline	
Regressionskoeffizient	-0,051
p-Wert	0,893
korrigiertes R^2	0,221
Gesamtscore Abschluss	
Regressionskoeffizient	6,244
p-Wert	<0,001

In Tabelle 15 ist der Einfluss der Gruppe auf den Gesamtscore sowohl für den Baseline- als auch den Abschlussfragebogen dargestellt. Es ist klar erkennbar, dass, während die Gruppe im Baseline-Fragebogen keinen Einfluss auf den Gesamtscore hat, es einen klaren Zusammen-

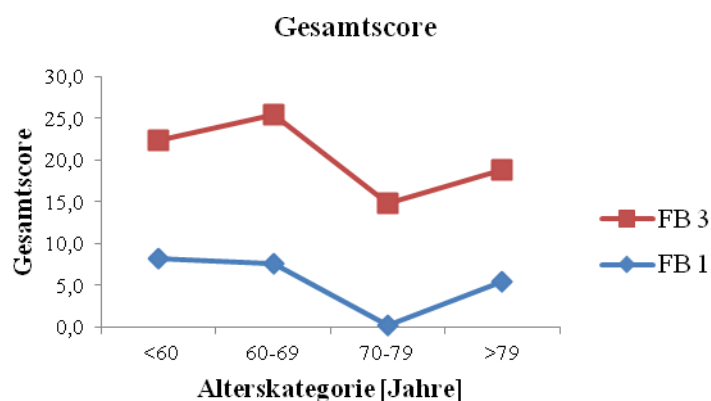
hang für den Abschlussfragebogen gibt, der sich mit der Schulung der Patienten in der Interventionsgruppe erklären lässt.

Tabelle 16: Einfluss des Geschlechts

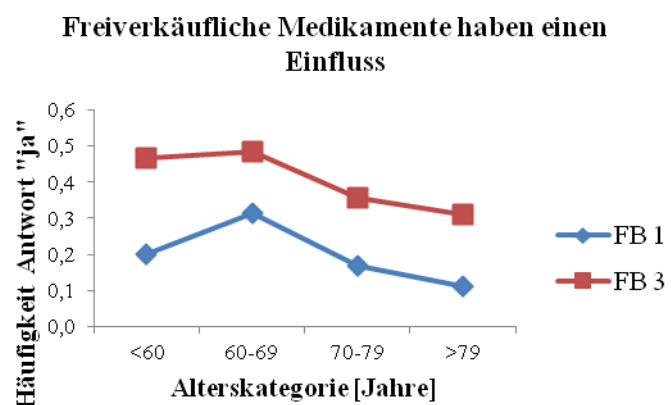
		Geschlecht
Alle	korrigiertes R^2	0,010
	Regressionskoeffizient	-0,624
	p -Wert	0,044
Intervention	korrigiertes R^2	0,018
	Regressionskoeffizient	-0,740
	p -Wert	0,037

In Tabelle 16 ist der Gesamtscore der Ernährungsfragen für den Abschlussfragebogen dargestellt. Es ist klar erkennbar, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluss hat. Frauen kennen sich in Ernährungsfragen deutlich besser aus.

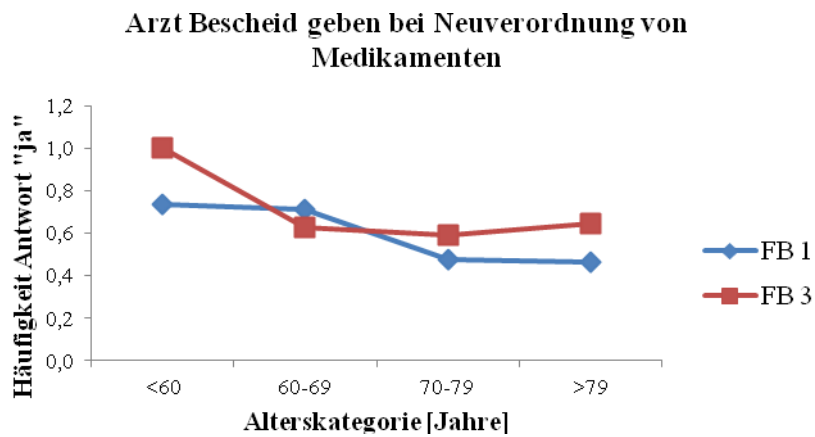
(A)



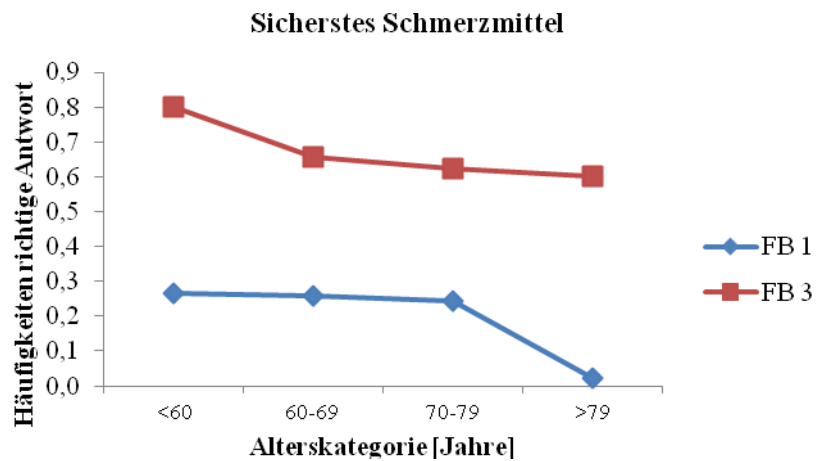
(B)



(C)



(D)



(E)

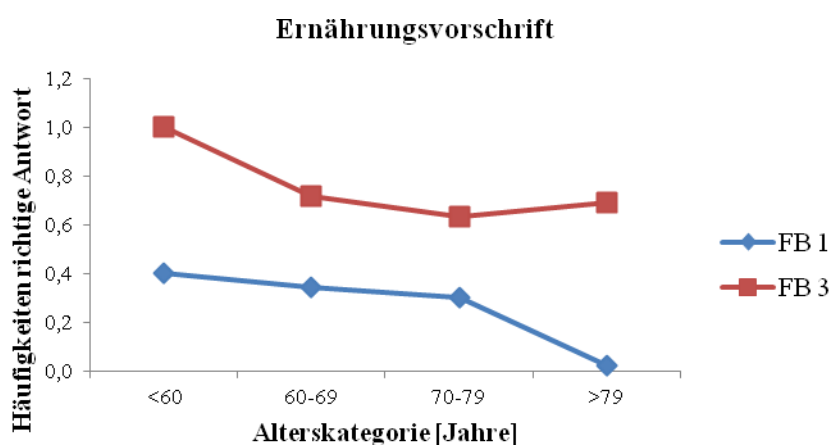


Abbildung 5 A–E: Regression von Alterskategorie und der Häufigkeit relevante Fragen richtig beantwortet zu haben unterteilt nach Fragebogen 1 und Fragebogen 3 innerhalb der Interventionsgruppe

Für die einzelnen Fragen ist klar feststellbar, dass mit steigendem Alter das Wissen in den Gruppen nachlässt (Abbildung 5, A–E). Der Gesamtscore hingegen hat seinen niedrigsten Wert in der Gruppe der 70 bis 79-Jährigen, während er danach wieder sowohl für den Baseline- als auch den Abschlussfragebogen ansteigt (Abbildung 5, A). Bei der Frage nach freiverkäuflichen Medikamenten ist nur ein geringer Unterschied zwischen den beiden Fragebögen erkennbar, zum Teil ist das Wissen im Abschlussfragebogen geringer als im Baseline-Fragebogen (Abbildung 5, B). Diese Frage zeigt, dass hier noch intensiver geschult werden muss.

3.4 Angehörige

3.4.1 Soziodemographische Daten

Tabelle 17: Soziodemographische Daten der Angehörigen

		Kontrolle	Intervention
Geschlecht	Weiblich	8	5
	Männlich	1	3
Alter	Mittelwert	67,1	68,1
	Median	76,0	75,5
	Minimum	41,0	45,0
	Maximum	88,0	86,0

In Tabelle 17 sind aufgrund der geringen Anzahl an Angehörigen nur absolute Zahlen angegeben. Da nur wenig Angehörige an der Studie teilgenommen haben, ist die Verteilung nicht ganz so gleichmäßig wie bei den Patienten. Dies gilt insbesondere für die Geschlechterverteilung. Lediglich im Alter sind die beiden Gruppen nahezu gleich. Da sich aufgrund der kleinen Stichprobe nur wenig Aussagen treffen lassen, soll die Auswertung auch nicht ganz so ausführlich sein wie für die Patienten.

3.4.2 Gesamtscore

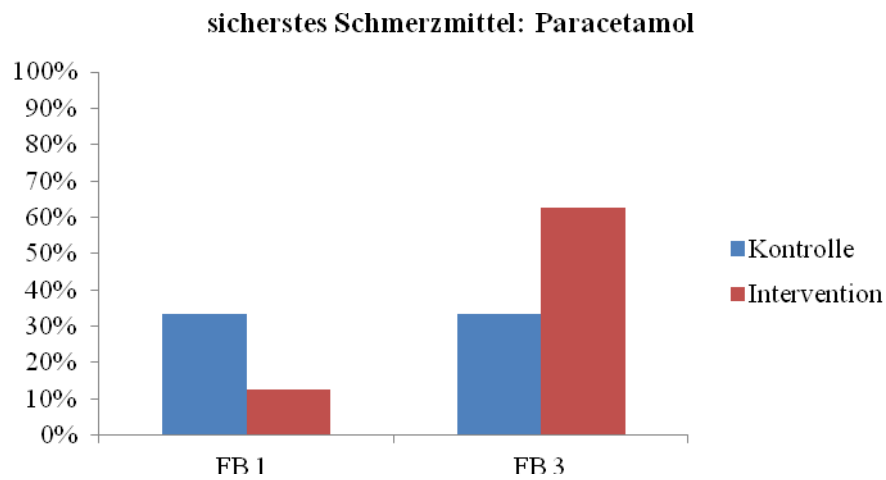
Tabelle 18: Gesamtscore für Angehörige

		Baseline (1)	Abschluss (3)	<i>t</i> -Test zwischen 1 und 3	Differenz zwischen 1 und 3
Kontrolle	Mittelwert	11,111	5,667	0,019	-5,444
	Standardabweichung	4,595	4,873		5,548
	Minimum	3,0	-4,00		-17,00
	Maximum	19,0	11,0		2,00
Intervention	Mittelwert	7,625	15,250	0,013	7,625
	Standardabweichung	6,906	7,363		6,545
	Minimum	-1,00	3,00		1,00
	Maximum	20,00	24,00		19,00
<i>t</i>-Test zwischen Kon- trolle und Intervention		0,234	0,006	---	<0,001

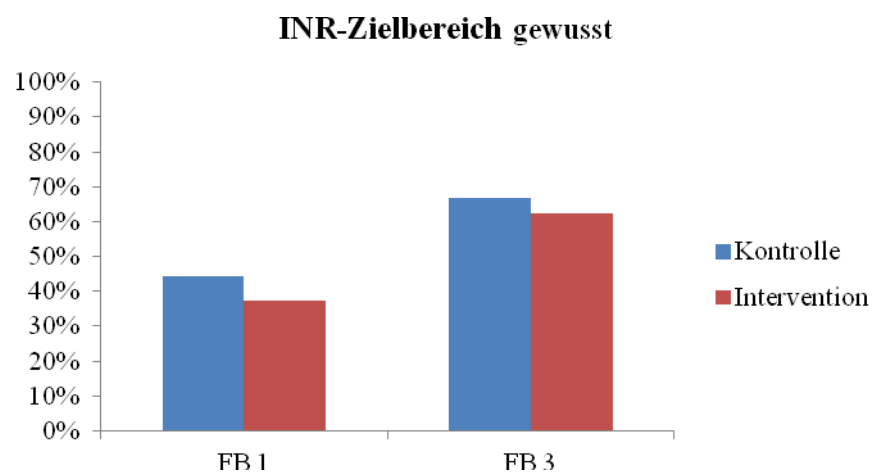
Tabelle 19: Ergebnisse ausgewählter Wissensfragen der Angehörigen

		Kontrolle	Intervention
Ernährungsvorschrift: regelmäßig Salat und Gemüse	Baseline	44,4%	62,5%
	Abschluss	22,2%	87,5%
sicherstes Schmerzmittel: Paracetamol	Baseline	33,3%	12,5%
	Abschluss	33,3%	62,5%
INR gewusst	Baseline	44,4%	37,5%
	Abschluss	66,7%	62,5%
freiverkäufliche Medikamente haben einen Einfluss	Baseline	33,3%	37,5%
	Abschluss	11,1%	50,0%

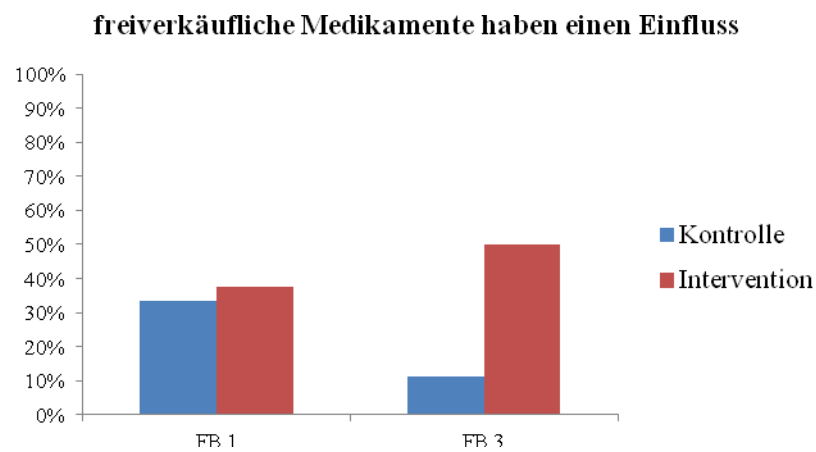
(A)



(B)



(C)



(D)

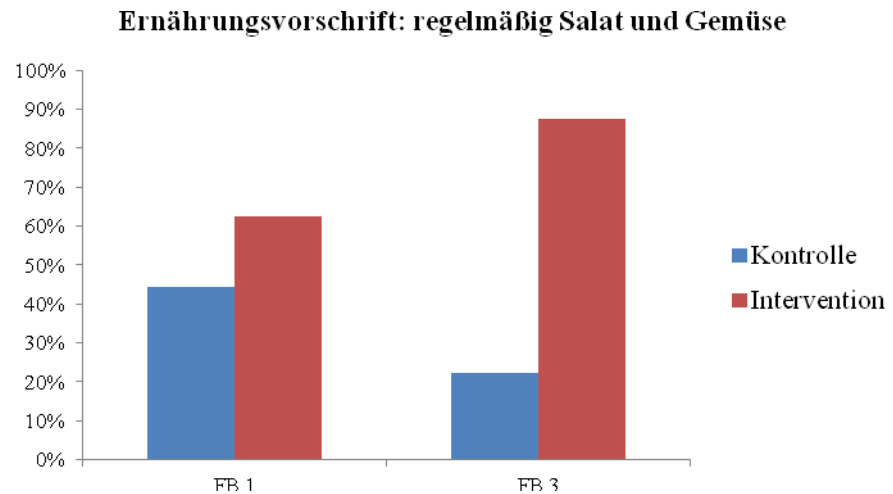


Abbildung 6 A-D: Wissenszuwachs der Angehörigen

Auch für die Angehörigen lässt sich ein Wissenszuwachs sowohl für die einzelnen Fragen als auch für den Gesamtscore erkennen (Tabelle 18). Die Angehörigen konnten ihr Wissen in Bezug auf sicherstes Schmerzmittel, freiverkäufliche Medikamente und Ernährungsvorschrift deutlich verbessern (Tabelle 19, Abbildung 6). Auch der INR-Zielbereich ist häufiger bekannt. In der Kontrollgruppe kam es zum Teil zu Verschlechterungen. Da, wie bereits erwähnt, die Gruppe zu klein ist, lassen sich nur schwer Aussagen treffen. Es lässt sich jedoch sagen, dass eine Schulung von Angehörigen auch von Bedeutung für das Wissen der Angehörigen ist. Inwieweit das die Therapie der Patienten mit oralen Antikoagulantien beeinflusst, muss noch untersucht werden.

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Studie zeigt, dass das sicherheitsrelevante Wissen zur Einnahme von oralen Antikoagulantien bei den Patienten gering ist. Die komplexe Intervention verbessert das Wissen deutlich und nachhaltig. Insbesondere am Gesamtscore lässt sich der Wissenszuwachs deutlich erkennen. Bei einem maximalen Gesamtscore von 27 Punkten konnte in der Interventionsgruppe der Score durch die Intervention um 8 Punkte verbessert werden, während er in der Kontrollgruppe nur um 1 stieg. Die Patienten fühlten sich nach dem Schulungsprogramm sicherer in Bezug auf die Einnahme von Phenprocoumon. In Bezug auf die Komplikationsrate konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es lässt sich nur einen Tendenz zu Gunsten einer höheren Komplikationsrate erkennen. Dies lässt sich jedoch dadurch erklären, dass zum einen durch die Schulung das Bewusstsein der Patienten für Komplikationen geschärft wurde, aber zum anderen auch, dass Patienten aufmerksamer in Bezug auf ihre Einnahme durch die ihnen entgegengebrachte Aufmerksamkeit (Hawthorne-Effekt) und das Wissen, dass man an einer Studie teilnimmt, geworden sind (Schwartz, Fischhoff et al. 2013).

Die Zeit im therapeutischen Bereich scheint sich tendenziell zu erhöhen, jedoch handelt es sich hierbei um keine signifikanten Ergebnisse. Das Alter zeigt einen Einfluss zugunsten der jüngeren Patienten. Betrachtet man die Wissenseseinschätzung der Patienten, lässt sich hier ein Zusammenhang erkennen. Je besser die Patienten ihr Wissen einschätzen, umso höher ist ihr Gesamtscore. Sowohl Kontrolle als auch Intervention möchten keine Schulung im Krankenhaus, sondern präferieren eine Schulung in der Hausarztpraxis, wobei dieser Unterschied in der Interventionsgruppe noch deutlicher ist. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass die Schulung in der Hausarztpraxis erfolgt ist und die Patienten hier nun ein genaues Bild von dem Ablauf einer solchen Schulung haben. Desweiteren ist oftmals die Hausarztpraxis vertrauter als das Krankenhaus. Man kennt den Arzt und die medizinischen Fachangestellten, auch die Räumlichkeiten sind bekannt und oft wird sowohl im Wartezimmer als auch im Behandlungsraum eine angenehme Atmosphäre geschaffen, während viele Krankenhäuser kalt und steril wirken können und oft sehr anonym sind.

4.2 Stärken der Studie

Nach ausgiebiger Literaturrecherche handelt es sich bei dieser Studie um die bisher größte zum Thema Schulung von Patienten mit oraler Antikoagulation. Das Besondere dieser Studie liegt vor allem in der Erforschung der Nachhaltigkeit hinsichtlich der Wissensvermittlung. So wird das Wissen noch sechs Monate nach Studienbeginn überprüft und die INR über einen längeren Zeitraum (sechs Monate vor und sechs Monate nach Studienbeginn) notiert und analysiert. Die Überprüfung der Intervention erfolgte erst nach sechs Monaten, was Nachhaltigkeit zeigt. Besonders interessant wird die Studie aufgrund der komplexen Intervention, die vier verschiedene Elemente hat. So wird die persönliche Schulung mittels einer medizinischen Fachangestellten mithilfe eines Videos, einer Broschüre und eines Fragebogens unterstützt. Zudem besitzt der Patient die Möglichkeit, jederzeit das relevante Wissen nachzulesen. Vor allem das Wiederholen der gleichen Inhalte in derselben Reihenfolge sowohl in Video als auch Broschüre hilft beim Lernen.

4.3 Schwächen der Studie

Dass keine Senkung der Komplikationsrate erzielt werden konnte, lässt sich durch die Beobachtungsdauer der Studie und die für diesen Endpunkt niedrige Stichprobengröße begründen. Auch wenn das sicherheitsrelevante Wissen steigt, so ist die Studie doch zu kurz, um eine Aussage zu treffen, da Komplikationen nicht allzu häufig auftreten, um sie signifikant zusammenfassen zu können. Außerdem haben zu wenige Patienten an der Studie teilgenommen. Zwar gilt diese Studie als die größte für die Schulung von Patienten mit oraler Antikoagulation, dennoch lassen sich bei einer solchen geringen Patientenanzahl keine signifikanten Ergebnisse herleiten. Das Gleiche gilt auch für die INR-Werte. So lässt sich vermuten, dass, wenn man über einen längeren Zeitraum gemessen hätte und die Patienten die Möglichkeit gehabt hätten, das Erlernte langsam in ihren Alltag zu integrieren, die Zeit im therapeutischen Bereich erhöht worden wäre, wie bereits die Tendenz zeigt.

Zudem muss erwähnt werden, dass hauptsächlich Praxen an der Studie teilgenommen haben, die besonders gut eingestellte Patienten haben und die um eine ausreichende Aufklärung des Patienten bemüht sind. Man kann vermuten, dass die Ergebnisse in anderen Praxen wesentlich signifikanter ausgefallen wären und sich eventuell in Bezug auf die Komplikationsraten

ein Unterschied hätte erkennen lassen können, da in solchen Praxen die Komplikationsrate höher sein müsste.

Inwieweit das Video, die Broschüre oder die Schulung durch die medizinische Fachangestellte den größten Beitrag zur Effektivität der Schulung leisten, lässt sich leider nicht sagen, da Studienarme lediglich mit der persönlichen Schulung oder nur durch das Video fehlen. Vermutlich wird das Video zu einem Grundwissen geführt haben und die Vertiefung mithilfe der medizinischen Fachangestellten das Wissen gefestigt haben, deshalb sollte auch für zukünftige Schulungen eine Kombination aus beiden Elementen in Betracht gezogen werden. Der Vergleich der Ergebnisse von Zwischenerhebung und Abschluss zeigt, dass ein Teil des erlernten Wissens über einen gewissen Zeitraum verloren geht. Auch wenn dies nicht oft der Fall ist, so ist der Wissensverlust doch an einigen Stellen signifikant und sollte berücksichtigt werden. Das zeigt, dass eine einmalige Schulung nicht reicht und Patienten das Gelernte in regelmäßigen Abständen wiederholen sollten.

Auch für die Angehörigen konnte eine Steigerung des sicherungsrelevanten Wissens gezeigt werden. Leider war die Auswertung für diese Patientengruppe nur begrenzt möglich. Man konnte erkennen, dass es auch hier einen Wissenszuwachs gab. Jedoch war die Gruppe zu klein, um eine Aussage über den Schulungseffekt von Angehörigen und deren Einfluss auf die pflegenden Patienten und deren Therapie mit oralen Antikoagulantien zu treffen. Dennoch muss betont werden, dass diese Studie eine der ersten ist, die Angehörige mit einschließt. Der Grund für die geringe Teilnahme bestand darin, dass sie völlig freiwillig und dementsprechend die Resonanz nur gering war. Für die Zukunft lässt sich empfehlen, eine reine Angehörigen-Studie zu planen bzw. einen Studienarm nur mit Angehörigen.

4.4 Ausblick

4.4.1 Neue orale Antikoagulantien

Natürlich stellt sich die Frage, inwieweit eine Schulung für Patienten, die Phenprocoumon einnehmen, sinnvoll erscheint in Anbetracht der Tatsache, dass immer mehr neue Antikoagulantien auf den Markt kommen, wie der Thrombin-Inhibitor Dabigatran (Pradaxa®), die Faktor-Xa-Inhibitoren Rivaroxaban (Xarelto®) und Apixaban (Eliquis®). Auf den ersten Blick scheinen die neuen Antikoagulantien viele Vorteile gegenüber Phenprocoumon zu haben. Jedoch sind die neuen Antikoagulantien wesentlich teurer als das Phenprocoumon. Während

Phenprocoumon pro Tag 0,20 Euro kostet, sind das bei Dabigatran ca. 3,40 Euro. Das würde bedeuten, dass, wenn alle 300 000 Patienten mit Vorhofflimmern in Deutschland statt Phenprocoumon Dabigatran einnehmen, 350,4 Millionen Euro pro Jahr zusätzlich finanziert werden müssten (Osterspey and Zylka-Menhorn 2011). Außerdem sind bisher keine spezifischen Antidots für den Fall einer Vergiftung vorhanden. Im Hinblick auf die Bedeutung begleitender Erkrankungen (z. B. Leberschäden) und die Interaktion mit anderen Wirkstoffen (z. B. Verapamil bei Dabigatran) müssen noch breitere Erkenntnisse gewonnen werden. Auch durch die vorwiegend renale Ausscheidung ist bei älteren Patienten Vorsicht geboten. Obwohl die Zukunft der Antikoagulantien noch nicht ganz klar ist, so lässt sich sicher sagen, dass Phenprocoumon für die nächsten Jahre noch von großer Relevanz sein wird. Sollten die neuen Antikoagulantien das Phenprocoumon verdrängen, so ist auch hier eine Schulung der Patienten erforderlich. Zwar erfordern diese Medikamente keine Ernährungsvorschrift, dennoch sollte der Patient Warnsymptome und Interaktionen kennen.

4.4.2 Übertragbarkeit der Schulung

Was für die neuen Antikoagulantien gilt, gilt auch für andere Medikamente. Auch wenn die Schulung nur für Patienten mit oraler Antikoagulation untersucht wurde, ist denkbar, dass sie auch auf andere Behandlungen übertragbar ist, insbesondere die verschiedenen Elemente der Schulung könnten eine große Rolle spielen. Es scheint trivial, dass wenn man Patienten schult diese auch zwangsläufig etwas lernen. Ausschlaggebend ist jedoch welche Form der Schulung den größten Effekt aufweist. Es zeigt sich deutlich, dass es sich bei dieser komplexen Schulung um erfolgreiche Elemente handelt. Ein Video zur Erlangung von Wissen für Patienten mit einem photographischen Gedächtnis ist sinnvoll. Zudem kann es mit nach Hause genommen und jeder Zeit abgespielt werden um das Gelernte zu wiederholen bzw. nochmal abzurufen. Die Wiederholung mit der medizinischen Fachangestellten und die Möglichkeit zum Stellen individueller Fragen sind auch von großer Bedeutung und sollten als Vorbild für weitere Schulungen in Betracht gezogen werden. Auch der 2. Fragebogen in der Interventionsgruppe stellt ein wichtiges Element der Schulung dar. Durch diese Zwischenerhebung waren die Patienten gezwungen, dass noch vor einem Monat erlernte abzurufen und zu wiederholen, was gleichzeitig zu einer Festigung führte. Vorstellbar wären Schulungen für Erkrankungen wie Diabetes, Asthma und Rheuma. Zwar sind die Schulungen auf diesem Gebiet schon sehr fortgeschritten und effektiv, dennoch ist eine Vereinfachung und Verbesserung durch eine persönliche und videounterstützte Schulung denkbar.

4.5 Vorschläge zur Verbesserung der Schulung

Die Ergebnisse zeigen einen bedeutsamen Wissenszuwachs. Es kann nur vermutet werden, dass die Schulung zu einer klinisch relevanten Verbesserung der Therapiesicherheit führt. Dazu ist eine längere Studie mit einer höheren Probandenzahl notwendig. Es ist denkbar, dass Patienten noch stärker in die Schulung integriert werden sollten. Es ist bekannt, dass die Interaktivität für Patienten eine wichtige Rolle spielt. So könnten Lernerfolgskontrollen, in denen regelmäßig das sicherheitsrelevante Wissen abgefragt wird, helfen, das Erlernte zu verfestigen und die Notwendigkeit einer Nachschulung zu überprüfen. Verhaltensmodifizierende Maßnahmen könnten in das Video oder in die Broschüre eingebracht werden. So sind z. B. Rezeptideen für Patienten mit oraler Antikoagulation mit einer Art Ampelsystem (von viel Vitamin K bis wenig Vitamin K) oder Poster zum Aufhängen mit den wichtigsten Warnsymptomen denkbar. Noch größere Effekte würden erzielt werden, wenn man das Video den Patienten mit nach Hause gibt. So hätten sie die Möglichkeit, einzelne Szenen wiederholt zu sehen und nicht Verstandenes noch einmal erklärt zu bekommen. Zwar durfte der Patient in der Studie sowohl in der Kontroll- als auch Interventionsgruppe eine Broschüre mit nach Hause nehmen, aber so scheint diese allein, wie die Ergebnisse in der Kontrollgruppe zeigen, kaum effektiv zu sein. Dies lässt sich dadurch erklären, dass gerade älteren Patienten das Lesen und Konzentrieren schwer fällt, vor allem schwerer als bei multimedialen Elementen. Außerdem besteht so die Möglichkeit, Familienmitglieder und Angehörigen das Video zu zeigen und sie aktiv in die Behandlung zu involvieren.

4.6 Schlussfolgerung

Auch wenn die Therapie mit Phenprocoumon mit vielen Risiken verbunden ist, so ist diese derzeit noch die beste und am meisten etablierte Methode, um thromboembolischen Ereignissen vorzubeugen. Der Patient ist oft unsicher zu Beginn der Therapie und hat mit Ängsten und Fragen zu kämpfen. Gerade deshalb ist die Aufklärung und Schulung zum Umgang mit der Erkrankung und Therapie die beste Methode, um Ängste zu vermindern und die Lebensqualität zu steigern. Deshalb sollte jeder Patient mit oraler Antikoagulation in Bezug auf alle wichtigen Aspekte, insbesondere der Arzneimittelinteraktionen, dem Verhalten in besonderen Situationen und der Ernährung so verständlich wie möglich geschult sowie sein Vertrauen in die Therapie gestärkt werden. Die Studie konnte zeigen, dass eine Video-gestützte Schulung

durch eine medizinische Fachangestellte in Hausarztpraxen durchführbar ist und für die Patientensicherheit relevantes Wissen zur oralen Antikoagulation nachhaltig verbessert. Auch wenn die Studie die Zeit im therapeutischen Bereich möglicherweise nur gering beeinflusst und zum Nachweis von Effektivität auf ernste Komplikationen zu klein war, sollten Schulungen angesichts des niedrigen sicherheitsrelevanten Wissens der Patienten bei Studieneinschluss in der Regelversorgung etabliert werden.

ANHANG



Nr. _____

Fragebogen Nr.1 (Eingangsfragebogen)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,
sehr geehrte Angehörige,

gehen Sie bitte die Fragen der Reihe nach durch und beachten Sie die folgenden Hinweise:

- Beantworten Sie bitte **jede Frage**.
- Setzen Sie **ein Kreuz** in das (am ehesten) zutreffende Kästchen oder schreiben Sie die **Antwort an die vorgesehene Stelle**.
- Wenn keine Mehrfachnennung angeboten wird, kreuzen Sie bitte pro Frage **nur ein** Kästchen an.

1. Wer füllt diesen Fragebogen aus?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> [1] Patient(in) | <input type="checkbox"/> [3] Angehörige |
| <input type="checkbox"/> [2] Patient(in) und Arzthelferin (MFA) | <input type="checkbox"/> [4] Angehörige und Arzthelferin (MFA) |

2. Welches Geschlecht haben Sie?

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> [1] weiblich | <input type="checkbox"/> [2] männlich |
|---------------------------------------|---------------------------------------|

3. Wie alt sind Sie?

____ Jahre

4. Was ist Ihr höchster Schulabschluss?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] Hauptschule/Volksschule | <input type="checkbox"/> [4] Hochschulreife/Abitur |
| <input type="checkbox"/> [2] Realschule/Polytechnische
Oberschule | <input type="checkbox"/> [5] anderer Schulabschluss |
| <input type="checkbox"/> [3] Fachhochschulreife | <input type="checkbox"/> [6] kein Schulabschluss |

5. Was ist der höchste erworbene Abschluss Ihrer Berufsausbildung?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> [1] Lehre (berufliche/betriebliche
Ausbildung) | <input type="checkbox"/> [4] Universität/Hochschule |
| <input type="checkbox"/> [2] Fachschule (Meister-, Techniker-,
Berufsakademie) | <input type="checkbox"/> [5] andere Berufsausbildung |
| <input type="checkbox"/> [3] Fachhochschule | <input type="checkbox"/> [6] keine Berufsausbildung |

6. Gehen Sie einer Erwerbstätigkeit nach?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] ganztags/Vollzeit | <input type="checkbox"/> [6] Hausfrau/Hausmann |
| <input type="checkbox"/> [2] mindestens halbtags/Teilzeit | <input type="checkbox"/> [7] arbeitslos/erwerbslos |
| <input type="checkbox"/> [3] Ausbildung/Lehre/Weiterbildung/
Umschulung | <input type="checkbox"/> [8] Mini-Job/Ein-Euro-Job/ weniger als
Halbtags |
| <input type="checkbox"/> [4] Altersrente | <input type="checkbox"/> [9] sonstiges |
| <input type="checkbox"/> [5] Altersteilzeit | |



Nr. _____

7. Ich schätze mein Wissen über den Umgang mit Gerinnungshemmern so ein:

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] sehr gut | [2] gut | [3] mittelmäßig | [4] unzureichend |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

8. Die Behandlung mit Gerinnungshemmern schränkt mein Leben ein.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

9. Ich habe Angst vor einer Gerinnselbildung.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

10. Ich habe Angst vor Blutungskomplikationen.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

11. Sind schon einmal Komplikationen durch Ihren Gerinnungshemmer eingetreten?

- ☐ [1] Ja, welche: _____
- ☐ [2] Nein

12. Weshalb nehme ich Gerinnungshemmer ein? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> [1] Herzrhythmusstörung | <input type="checkbox"/> [4] künstliche Gefäß-Prothese |
| <input type="checkbox"/> [2] Beinvenen-Thrombose | <input type="checkbox"/> [5] künstliche Herzklappe(n) |
| <input type="checkbox"/> [3] Lungenembolie | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

13. Die Einnahme eines Gerinnungshemmers soll für mich welches Risiko senken?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] Thrombose / Lungenembolie | <input type="checkbox"/> [3] Herzinfarkt |
| <input type="checkbox"/> [2] Schlaganfall | <input type="checkbox"/> [4] weiß ich nicht |

14. Wie lange muss ich voraussichtlich meinen Gerinnungshemmer einnehmen?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> [1] mehrere Wochen | <input type="checkbox"/> [4] immer |
| <input type="checkbox"/> [2] mehrere Monate | <input type="checkbox"/> [5] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [3] mehrere Jahre | |

15. Wie häufig sollte die Blutgerinnung in der Regel kontrolliert werden?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> [1] einmal pro Woche | <input type="checkbox"/> [3] vierteljährlich |
| <input type="checkbox"/> [2] einmal pro Monat | <input type="checkbox"/> [4] weiß ich nicht |



Nr.

16. Meine Blutgerinnung sollte im folgenden Bereich liegen (Quick-Wert oder INR):

☐ [1] Zielbereich soll zwischen _____ und _____ liegen. ☐ [2] weiß ich nicht

17. Welche Lebensmittel enthalten in üblicher Verzehrmenge viel oder wenig Vitamin-K?

	[1] wenig oder kein Vitamin-K	[2] viel Vitamin-K	[3] weiß ich nicht
Kohlsorten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kartoffeln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Äpfel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grüner Salat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomaten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Spinat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zwiebeln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

18. Muss ich bei der Einnahme von Gerinnungshemmern eine spezielle Ernährungsvorschrift einhalten?

- ☐ [1] extra viel Salat und Gemüse ☐ [3] regelmäßig Salat und Gemüse
☐ [2] Salat und Gemüse meiden ☐ [4] weiß ich nicht

19. Welches freiverkäufliche Schmerzmittel ist bei Einnahme von Gerinnungshemmern am sichersten?

- ☐ [1] Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®) ☐ [4] Paracetamol
☐ [2] Diclofenac (z.B. Voltaren®) ☐ [5] Mischpräparate (z.B. Thomapyrin®)
☐ [3] Ibuprofen ☐ [6] weiß ich nicht

20. Wie lange sollte ich eine vergessene Einnahme meines Gerinnungshemmers noch nachholen?

- ☐ [1] bis zu 2 Stunden ☐ [4] bis zu einem Tag
☐ [2] bis zu 6 Stunden ☐ [5] weiß ich nicht
☐ [3] bis zu 12 Stunden

21. Ich merke, dass mein Blut zu wenig „verdünnt“ ist, an:

- ☐ [1] Gelenkschmerzen ☐ [4] Das merke ich praktisch nicht.
☐ [2] plötzlichen Kopfschmerzen ☐ [5] weiß ich nicht
☐ [3] Durchfall



Nr.

22. Was kann die Wirkung der Gerinnungshemmer wesentlich verstärken oder abschwächen? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> [1] regelmäßige Bewegung | <input type="checkbox"/> [6] Zimt |
| <input type="checkbox"/> [2] Magen-Darm-Infekt | <input type="checkbox"/> [7] Fastendiät |
| <input type="checkbox"/> [3] Fieber | <input type="checkbox"/> [8] mäßiger Alkoholenuss |
| <input type="checkbox"/> [4] Kaffee | <input type="checkbox"/> [9] freiverkäufliche Medikamente |
| <input type="checkbox"/> [5] Ginkgo | <input type="checkbox"/> [10] weiß ich nicht |

23. In welchen Situationen sollte ich am selben Tag noch eine Ärztin/ einen Arzt kontaktieren? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> [1] bei schmerzhaften Schwellung mit und ohne Bluterguss | <input type="checkbox"/> [4] Schwäche im linken Arm auch vorübergehend |
| <input type="checkbox"/> [2] plötzliche Sprachstörung | <input type="checkbox"/> [5] bei jeder Schnittverletzung |
| <input type="checkbox"/> [3] schwarzer Stuhlgang | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

24. Wann sollte ich darauf hinweisen, dass ich einen Gerinnungshemmer einnehme? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] beim Zahnarztbesuch | <input type="checkbox"/> [4] bei Neuverordnungen von Medikamenten |
| <input type="checkbox"/> [2] in der Apotheke | <input type="checkbox"/> [5] vor geplanten Operationen |
| <input type="checkbox"/> [3] vor einer Injektion | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

**So, endlich geschafft.
Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Mitarbeit!**

Praxis-Nr.

Patienten-Nr.



UNIVERSITÄTSMEDIZIN
GÖTTINGEN : **UMG**

Fragebogen Nr.2 (Nachbefragung)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,
sehr geehrte Angehörige,

gehen Sie bitte die Fragen der Reihe nach durch und beachten Sie die folgenden Hinweise:

- Beantworten Sie bitte **jede Frage**.
- Setzen Sie **ein Kreuz** in das (am ehesten) zutreffende Kästchen oder schreiben Sie die **Antwort an die vorgesehene Stelle**.
- Wenn keine Mehrfachnennung angeboten wird, kreuzen Sie bitte pro Frage **nur ein** Kästchen an.

1. Ich schätze mein Wissen über den Umgang mit Gerinnungshemmern so ein:

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] sehr gut | [2] gut | [3] mittelmäßig | [4] unzureichend |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

2. Die Behandlung mit Gerinnungshemmern schränkt mein Leben ein.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

3. Ich habe Angst vor einer Gerinnselbildung.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

4. Ich habe Angst vor Blutungskomplikationen.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

5. Weshalb nehme ich Gerinnungshemmer ein? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> [1] Herzrhythmusstörung | <input type="checkbox"/> [4] künstliche Gefäß-Prothese |
| <input type="checkbox"/> [2] Beinvenen-Thrombose | <input type="checkbox"/> [5] künstliche Herzklappe(n) |
| <input type="checkbox"/> [3] Lungenembolie | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

6. Die Einnahme eines Gerinnungshemmers soll für mich welches Risiko senken?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] Thrombose / Lungenembolie | <input type="checkbox"/> [3] Herzinfarkt |
| <input type="checkbox"/> [2] Schlaganfall | <input type="checkbox"/> [4] weiß ich nicht |

7. Wie lange muss ich voraussichtlich meinen Gerinnungshemmer einnehmen?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> [1] mehrere Wochen | <input type="checkbox"/> [4] immer |
| <input type="checkbox"/> [2] mehrere Monate | <input type="checkbox"/> [5] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [3] mehrere Jahre | |



8. Wie häufig sollte die Blutgerinnung in der Regel kontrolliert werden?

- ☐ [1] einmal pro Woche ☐ [3] vierteljährlich
☐ [2] alle 4 bis 6 Wochen ☐ [4] weiß ich nicht

9. In welchem Bereich soll mein Gerinnungswert liegen? (Quick-Wert oder INR)

- [1] Zielbereich soll zwischen _____ und _____ liegen. ☐ [2] weiß ich nicht

10. Welche Lebensmittel enthalten in üblicher Verzehrmenge viel Vitamin-K?

- ☐ [1] Kohlsorten ☐ [5] Tomaten-Konzentrat
☐ [2] Kartoffeln ☐ [6] Spinat
☐ [3] Äpfel ☐ [7] Zwiebeln
☐ [4] Grüner Salat ☐ [8] Zucchini

11. Muss ich bei der Einnahme von Gerinnungshemmern eine spezielle Ernährungsvorschrift einhalten?

- ☐ [1] extra viel Salat und Gemüse ☐ [3] regelmäßig Salat und Gemüse
☐ [2] Salat und Gemüse meiden ☐ [4] weiß ich nicht

12. Welches freiverkäufliche Schmerzmittel ist bei Einnahme von Gerinnungshemmern am sichersten?

- ☐ [1] Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®) ☐ [4] Paracetamol
☐ [2] Diclofenac (z.B. Voltaren®) ☐ [5] Mischpräparate (z.B. Thomapyrin®)
☐ [3] Ibuprofen ☐ [6] weiß ich nicht

13. Wenn ich eine Einnahme vergessen habe, wie lange sollte ich die noch nachholen?

- ☐ [1] bis zu 2 Stunden ☐ [4] bis zu einem Tag
☐ [2] bis zu 6 Stunden ☐ [5] weiß ich nicht
☐ [3] bis zu 12 Stunden

14. Woran merke ich, wenn meine Blutgerinnung nicht ausreichend gehemmt ist?

- ☐ [1] Gelenkschmerzen ☐ [4] Das merke ich praktisch nicht.
☐ [2] plötzlichen Kopfschmerzen ☐ [5] weiß ich nicht
☐ [3] Durchfall

15. Was kann die Wirkung der Gerinnungshemmer wesentlich beeinflussen? (Mehrfachnennung möglich)

- ☐ [1] regelmäßige Bewegung ☐ [6] freiverkäufliche Medikamente
☐ [2] Magen-Darm-Infekt ☐ [7] Fastendiät
☐ [3] Fieber ☐ [8] mäßiger Alkoholenuss
☐ [4] Kaffee ☐ [9] weiß ich nicht
☐ [5] Ginkgo



16. In welchen Situationen sollte ich am selben Tag noch eine Ärztin/ einen Arzt kontaktieren? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] bei schmerzhaften Schwellung mit und ohne Verfärbung der Haut | <input type="checkbox"/> [4] Schwäche im Arm auch vorübergehend |
| <input type="checkbox"/> [2] plötzliche Sprachstörung | <input type="checkbox"/> [5] bei kleinen Schnittverletzungen |
| <input type="checkbox"/> [3] schwarzer Stuhlgang | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

17. Wann sollte ich darauf hinweisen, dass ich einen Gerinnungshemmer einnehme? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] beim Zahnarztbesuch | <input type="checkbox"/> [4] bei Neuverordnungen von Medikamenten |
| <input type="checkbox"/> [2] in der Apotheke | <input type="checkbox"/> [5] vor geplanten Operationen |
| <input type="checkbox"/> [3] vor einer Injektion | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

**So, endlich geschafft.
Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Mitarbeit!**



Nr.

Fragebogen Nr.3 (Abschlussfragebogen)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,
sehr geehrte Angehörige,

gehen Sie bitte die Fragen der Reihe nach durch und beachten Sie die folgenden Hinweise:

- Beantworten Sie bitte **jede Frage**.
- Setzen Sie **ein Kreuz** in das (am ehesten) zutreffende Kästchen oder schreiben Sie die **Antwort an die vorgesehene Stelle**.
- Wenn keine Mehrfachnennung angeboten wird, kreuzen Sie bitte pro Frage **nur ein** Kästchen an.

1. Ich schätze mein Wissen über den Umgang mit Gerinnungshemmern so ein:

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] sehr gut | [2] gut | [3] mittelmäßig | [4] unzureichend |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

2. Die Behandlung mit Gerinnungshemmern schränkt mein Leben ein.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

3. Ich habe Angst vor einer Gerinnselbildung.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

4. Ich habe Angst vor Blutungskomplikationen.

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [1] stimme zu | [2] stimme eher zu | [3] stimme eher nicht zu | [4] stimme nicht zu |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

5. Weshalb nehme ich Gerinnungshemmer ein? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> [1] Herzrhythmusstörung | <input type="checkbox"/> [4] künstliche Gefäß-Prothese |
| <input type="checkbox"/> [2] Beinvenen-Thrombose | <input type="checkbox"/> [5] künstliche Herzklappe(n) |
| <input type="checkbox"/> [3] Lungenembolie | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

6. Die Einnahme eines Gerinnungshemmers soll für mich welches Risiko senken?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] Thrombose / Lungenembolie | <input type="checkbox"/> [3] Herzinfarkt |
| <input type="checkbox"/> [2] Schlaganfall | <input type="checkbox"/> [4] weiß ich nicht |

7. Wie lange muss ich voraussichtlich meinen Gerinnungshemmer einnehmen?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> [1] mehrere Wochen | <input type="checkbox"/> [4] immer |
| <input type="checkbox"/> [2] mehrere Monate | <input type="checkbox"/> [5] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [3] mehrere Jahre | |



Nr. _____

8. Wie häufig sollte die Blutgerinnung in der Regel kontrolliert werden?

- ☐ [1] einmal pro Woche ☐ [3] vierteljährlich
☐ [2] einmal pro Monat ☐ [4] weiß ich nicht

9. Meine Blutgerinnung sollte im folgenden Bereich liegen (Quick-Wert oder INR):

- [1] Zielbereich soll zwischen _____ und _____ liegen. ☐ [2] weiß ich nicht

10. Sind in den letzten 6 Monaten Komplikationen infolge der Einnahme von Gerinnungshemmern aufgetreten? (Mehrfachnennung möglich)

- ☐ [1] keine ☐ [5] Thrombose
☐ [2] Nasenbluten ☐ [6] andere
☐ [3] Darmblutungen ☐ [7] weiß ich nicht
☐ [4] Blutergüsse

11. Haben Sie sich in den letzten 6 Monaten zusätzlich über das Thema Blutgerinnung informiert? (Mehrfachnennung möglich)

- ☐ [1] nein ☐ [3] Bücher/ Zeitschriften
☐ [2] Internet ☐ [4] andere

12. Welche Lebensmittel enthalten in üblicher Verzehrmenge viel oder wenig Vitamin-K?

	[1] wenig oder kein Vitamin-K	[2] viel Vitamin-K	[3] weiß ich nicht
Kohlsorten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kartoffeln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Äpfel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grüner Salat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomaten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Spinat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zwiebeln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

13. Muss ich bei der Einnahme von Gerinnungshemmern eine spezielle Ernährungsvorschrift einhalten?

- ☐ [1] extra viel Salat und Gemüse ☐ [3] regelmäßig Salat und Gemüse
☐ [2] Salat und Gemüse meiden ☐ [4] weiß ich nicht

14. Welches freiverkäufliche Schmerzmittel ist bei Einnahme von Gerinnungshemmern am sichersten?

- ☐ [1] Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®) ☐ [4] Paracetamol
☐ [2] Diclofenac (z.B. Voltaren®) ☐ [5] Mischpräparate (z.B. Thomapyrin®)
☐ [3] Ibuprofen ☐ [6] weiß ich nicht



Nr.

15. Wie lange sollte ich eine vergessene Einnahme meines Gerinnungshemmers noch nachholen?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] bis zu 2 Stunden | <input type="checkbox"/> [4] bis zu einem Tag |
| <input type="checkbox"/> [2] bis zu 6 Stunden | <input type="checkbox"/> [5] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [3] bis zu 12 Stunden | |

16. Ich merke, dass mein Blut zu wenig „verdünnt“ ist, an:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] Gelenksmerzen | <input type="checkbox"/> [4] Das merke ich praktisch nicht. |
| <input type="checkbox"/> [2] plötzlichen Kopfschmerzen | <input type="checkbox"/> [5] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [3] Durchfall | |

17. Was kann die Wirkung der Gerinnungshemmer wesentlich verstärken oder abschwächen? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> [1] regelmäßige Bewegung | <input type="checkbox"/> [6] Zimt |
| <input type="checkbox"/> [2] Magen-Darm-Infekt | <input type="checkbox"/> [7] Fastendiät |
| <input type="checkbox"/> [3] Fieber | <input type="checkbox"/> [8] mäßiger Alkoholgenuss |
| <input type="checkbox"/> [4] Kaffee | <input type="checkbox"/> [9] freiverkäufliche Medikamente |
| <input type="checkbox"/> [5] Ginkgo | <input type="checkbox"/> [10] weiß ich nicht |

18. In welchen Situationen sollte ich am selben Tag noch eine Ärztin/ einen Arzt kontaktieren? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] bei schmerzhaften Schwellung mit und ohne Verfärbung der Haut | <input type="checkbox"/> [4] Schwäche im Arm auch vorübergehend |
| <input type="checkbox"/> [2] plötzliche Sprachstörung | <input type="checkbox"/> [5] bei jeder Schnittverletzung |
| <input type="checkbox"/> [3] schwarzer Stuhlgang | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

19. Wann sollte ich darauf hinweisen, dass ich einen Gerinnungshemmer einnehme? (Mehrfachnennung möglich)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> [1] beim Zahnarztbesuch | <input type="checkbox"/> [4] bei Neuverordnungen von Medikamenten |
| <input type="checkbox"/> [2] in der Apotheke | <input type="checkbox"/> [5] vor geplanten Operationen |
| <input type="checkbox"/> [3] vor einer Injektion | <input type="checkbox"/> [6] weiß ich nicht |

20. Musste in den letzten 6 Monaten die Einnahme von Gerinnungshemmern vorübergehend abgesetzt werden?

- | | |
|-----------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> [1] ja | <input type="checkbox"/> [3] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [2] nein | |

21. Sollten Patienten, bei Einstellung der Gerinnungshemmern an einem Schulungsprogramm teilnehmen?

- | | |
|-----------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> [1] ja | <input type="checkbox"/> [3] weiß ich nicht |
| <input type="checkbox"/> [2] nein | |



Nr. _____

22. Wenn ja, wo soll diese Schulung stattfinden?

- ☐ [1] Krankenhaus ☐ [3] Krankenkasse
☐ [2] Hausarztpraxis

23. Die Schulung sollte folgende Elemente enthalten?

	[1] stimme zu	[2] stimme eher zu	[3] stimme eher nicht zu	[4] stimme nicht zu
Broschüre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Video	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
persönliche Beratung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

So, endlich geschafft.
Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Mitarbeit!

Projekt II

**Venlafaxin und
O-Desmethylvenlafaxin
als Substrate der
Organischen Kationentransporter
OCT1 und OCT2**

1. EINLEITUNG

1.1 Die Krankheit Depression

Unter einer Depression versteht man eine den Lebensumständen nicht entsprechende und damit nicht begründbare psychische Verstimmung mit einer Störung der gesamten Affektivität (Mutschler 2006). Sie ist gekennzeichnet durch depressive Verstimmungen, gehemmtes Denken, psychomotorische Hemmungen, Vitalstörungen, Suizidgedanken und depressiven Wahnvorstellungen.

Schätzungen zufolge leiden weltweit inzwischen circa 350 Millionen Menschen unter einer Depression. Bis zum Jahr 2020 werden Depressionen oder affektive Störungen laut Weltgesundheitsorganisation weltweit die zweithäufigste Volkskrankheit sein (BMG 2013) und bis 2030 die häufigste (Mathers, Fat et al. 2008).

Grundlegend werden Depressionen mit Psychotherapie behandelt. Antidepressiva sind bei mittelschweren und insbesondere bei schweren depressiven Zuständen indiziert (Harter, Klesse et al. 2010). Sie wirken substanzabhängig in unterschiedlichem Ausmaß depressionslösend, stimmungsaufhellend und psychomotorisch aktivierend oder dämpfend. Antidepressiva (Mutschler 2006). Man unterscheidet je nach ihrer Wirkung zwischen Nichtselektiven Wiederaufnahmehemmern (Trizyklische Antidepressiva) und Selektiven Wiederaufnahmehemmern, zu denen die Selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), die Selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (NARI, SNRI), die Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (DRI, DARI), die Selektiven Serotonin-/Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI, SSNRI) und die Selektiven Noradrenalin-/Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (NDRI) gehören. Des Weiteren gibt es die Monoaminoxidase-Inhibitoren, seit einigen Jahren ein Melatoninderivat und Phytopharmaka, zu denen beispielsweise das Johanniskraut gehört.

Mit über 1 Milliarde definierter Tagesdosen (DDD), defined daily dose waren Antidepressiva 2009 die mit Abstand am häufigsten ambulant verordnete Gruppe von Psychopharmaka in Deutschland (Schwabe and Paffrath 2009). Venlafaxin ist dabei mit einer DDD von 75,1 Millionen in Deutschland an dritter Stelle der verordneten Antidepressiva. Die Firma Wyeth, heute Tochterunternehmen von Pfizer, hat nach Angaben der „New York Times“ im Jahr 2007 mit Venlafaxin 3,8 Milliarden Dollar verdient, welches somit als Blockbuster gilt.

1.2 Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

Venlafaxin ist der erste eingeführte Selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer und ist bekannt unter dem Handelsnamen Trevilor[®]. Anwendungsgebiete sind laut der Fachinformation die Behandlung von Episoden einer schweren Depression, die Behandlung sozialer Angststörungen und die Prävention des Wiederauftretens neuer depressiver Episoden (Rezidivprophylaxe).

Venlafaxin wirkt durch Hemmung der Wiederaufnahme der Neurotransmitter Serotonin mit einem K_i von 82 nM und Noradrenalin mit einem K_i von 2480 nM im Zentralnervensystem (Bymaster, Dreshfield-Ahmad et al. 2001). So bleiben beide Botenstoffe länger aktiv in der Synapse. Venlafaxin wird zu 90% resorbiert. Die Bioverfügbarkeit beträgt 12% und die Halbwertszeit 5 h. Es wird weitgehend in der Leber hauptsächlich mittels des Isoenzym CYP2D6 zu O-Desmethylvenlafaxin metabolisiert (Nichols, Focht et al. 2011). O-Desmethylvenlafaxin wirkt ähnlich wie die Muttersubstanz. Ein Unterschied besteht in der Halbwertszeit mit 11 h. Außerdem soll O-Desmethylvenlafaxin einen geringeren Serotonin/Noradrenalin-Selektivitäts-Quotienten besitzen (K_i von 40,2 nM für Serotonin und 558,4 nM für Noradrenalin (Deecher, Beyer et al. 2006)). Deswegen ist bei gleichstarker Inhibition der Serotonin-Wiederaufnahme durch Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin die Inhibition von Noradrenalin bei O-Desmethylvenlafaxin größer als bei Venlafaxin (Boyer, Montgomery et al. 2008).

Kurz vor dem Patentablauf von Venlafaxin beantragte die Firma Wyeth 2007 die Zulassung von O-Desmethylvenlafaxin als neuen Selektiven Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer in den USA (Pae 2009). Sie begründete einen Vorteil von O-Desmethylvenlafaxin gegenüber Venlafaxin damit, dass O-Desmethylvenlafaxin nicht durch das Isoenzym CYP2D6 verstoffwechselt werden müsste. CYP2D6 ist bekanntlich polymorph. Aufgrund dieser Polymorphismen besitzt das CYP2D6-Gen unterschiedliche Phänotypen mit unterschiedlichen Metabolisierungsgeschwindigkeiten. Bekannt sind die sogenannten poor metabolizer, intermediate metabolizer, extensive metabolizer und ultrarapid metabolizer (Zanger, Raimundo et al. 2004). Während die extensive metabolizer und die intermediate metabolizer mit einer Prävalenz von 80% am häufigsten auftreten und eine „normale“ Aktivität besitzen, beträgt die Prävalenz für poor metabolizer unter Kaukasiern 5-10%, unter Afrikanern 1-2% und unter Asiaten 1% (Nichols, Focht et al. 2011). Wyeth betonte, dass die he-

patische Metabolisierung und somit die Wirkung von O-Desmethylvenlafaxin weder von genetischen Polymorphismen noch von Arzneimittelinteraktionen mit dem P450-System beeinflusst würde. O-Desmethylvenlafaxin wurde 2008 unter dem Handelsnamen Pristiq[®] von der FDA in den USA nach Erfüllung bestimmter Auflagen zugelassen (Madison 2007). 2009 wurde O-Desmethylvenlafaxin in Kanada von der Health Canada ebenfalls unter den Handelsname Pristiq[®] zugelassen. Firma Wyeth schätzte Pristiq[®] als potenziellen Blockbuster ein, das jährlich einen Gewinn von einer Milliarde Dollar einbringen könnte. In Europa dagegen lehnte die EMEA (European Medicines Agency) eine solche Zulassung ab. Die Begründung war, dass O-Desmethylvenlafaxin weniger effektiv als Venlafaxin zu sein schiene, ohne dabei jedoch Vorteile in Bezug auf Sicherheit und Verträglichkeit zu haben (EMA 2009). Außerdem erachtete das wissenschaftliche Gremium Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) die Daten zur Kurz- und Langzeitwirkung von Venlafaxin als unzureichend (EMA 2009).

1.2.1 Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin als Kandidaten für die OCTs

Betrachtet man die Struktur von Venlafaxin und vergleicht diese mit der des Opioids Tramadol, so sind nur geringe Unterschiede erkennbar (Abbildung 7). Beide besitzen Methoxyphenol als Grundkörper, an dem bei Venlafaxin ein Hexanring und eine Dimethylaminogruppe hängen. Beim Tramadol verbindet der Hexanring den Phenylring mit der Diaminophenylgruppe. Tramadol wird in der Leber mittels CYP2D6 zu O-Desmethyltramadol verstoffwechselt, das von seiner Struktur wiederum dem O-Desmethylvenlafaxin ähnlich ist. Bei beiden wird dabei die Methoxygruppe demethyliert. Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass O-Desmethyltramadol ein klinisch relevantes Substrat des organischen Kationentransporters OCT1 (organic cation transporter 1), einen auf der sinusoidalen Seite der Leber exprimierten Influxtransporter, ist und es einen Einfluss bestimmter genetischer Varianten des OCT1 auf dessen Plasmaspiegel und die Wirkung gibt (Tzvetkov, Saadatmand et al. 2011).

Aufgrund der beschriebenen Strukturähnlichkeiten liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei Venlafaxin bzw. O-Desmethylvenlafaxin auch um Substrate der Organischen Kationentransporter handeln könnte.

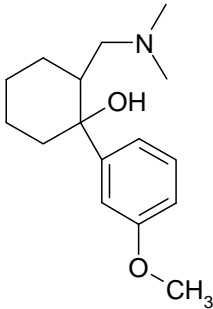
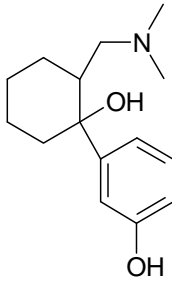
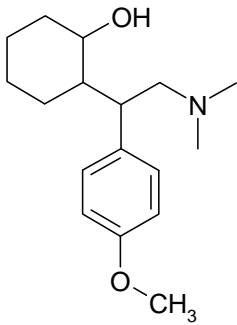
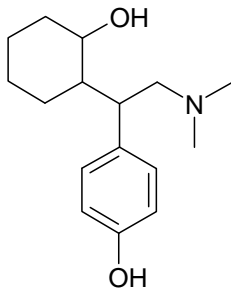
Tramadol	O-Desmethyltramadol
	
Venlafaxin	O-Desmethylvenlafaxin
	

Abbildung 7: Chemische Strukturen von Tramadol, O-Desmethyltramadol, Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

1.3 Organische Kationentransporter

Organische Kationentransporter (OCTs, organic cation transporters) gehören zur Familie des Solute-Carrier 22 (*SLC22A*). OCTs spielen eine wichtige Rolle in der Verteilung und Ausscheidung sowohl endogener als auch exogener Substanzen. Sie können Substanzen in beiden Richtungen entlang der Plasmamembran transportieren und sind für ihre Polyspezifität bekannt (Volk, Gorboulev et al. 2003). Das heißt, sie transportieren organische Kationen mit den unterschiedlichsten Strukturen und lassen sich gleichzeitig durch eine große Anzahl verschiedener Substanzen inhibieren (Koepsell, Schmitt et al. 2003). Bei den OCTs handelt es sich um elektrogene Transporter, die auf Veränderungen im Membranpotenzial reagieren (Urban, Yang et al. 2007; Koepsell 2011) und unabhängig von Natrium- oder Chloridionen und vermutlich auch von einem Protonengradienten sind (Schmitt and Koepsell 2005). Insgesamt

samt sind bisher drei Isoformen der *SLC22A*-Familie identifiziert, nämlich OCT1 (*SLC22A1*), OCT2 (*SLC22A2*) und OCT3 (*SLC22A3*). Diese drei Isoformen unterscheiden sich zwar nicht in ihrem Transportmechanismus, jedoch durch ihre Affinität zu unterschiedlichen Substraten und in ihrer Verteilung in den einzelnen Organen und Geweben (Koepsell, Schmitt et al. 2003).

1.3.1 Struktur und Gewebe-Lokalisation

Die Gene für alle drei Isoformen der OCTs sind auf dem Chromosom 6 an der Stelle 6q26-27 lokalisiert. Sie haben zwölf α -Helix-Transmembrandomänen mit intrazellulären terminalen Amino- und Carboxylgruppen und einer großen extrazellulären Schleife zwischen der Transmembrandomäne 1 und 2 und einer großen intrazellulären Schleife zwischen der Transmembrandomäne 6 und 7 (Abbildung 8). In der großen extrazellulären Schleife gibt es zwei bis fünf potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Die große intrazelluläre Schleife scheint für die Phosphorylierung mittels Proteinkinase C wichtig zu sein (Burckhardt and Wolff 2000; Koepsell, Lips et al. 2007). Durch gerichtete Mutagenese in Ratten im rOct1 konnte gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne 11 einen Einfluss auf die Substraterkennung hat, da hier eine spezifische Mutation zu einem verminderten Transport, also höheren K_m -Werten, führte (Gorboulev, Volk et al. 1999). Das Gleiche konnte an der Transmembrandomäne 4 festgestellt werden (Popp, Gorboulev et al. 2005). Eine Substratbindungsstelle an der Transmembrandomäne 11 ist vermutlich für die Translokation des Substrats verantwortlich (Egenberger, Gorboulev et al. 2012). Diese Daten lassen vermuten, dass es keine spezielle Substraterkennungsstelle gibt, sondern viele unterschiedliche, die zum Teil zwischen den einzelnen Substraten überlappen (Koepsell 2011). Außerdem wird vermutet, dass die extrazelluläre Schleife zwischen der Transmembrandomäne 1 und 2 auch einen Einfluss auf die Substrataffinität hat und dass diese Struktur zudem wichtig für den Ein- und Aufbau des OCTs in die Zellmembran ist (Keller, Egenberger et al. 2011).

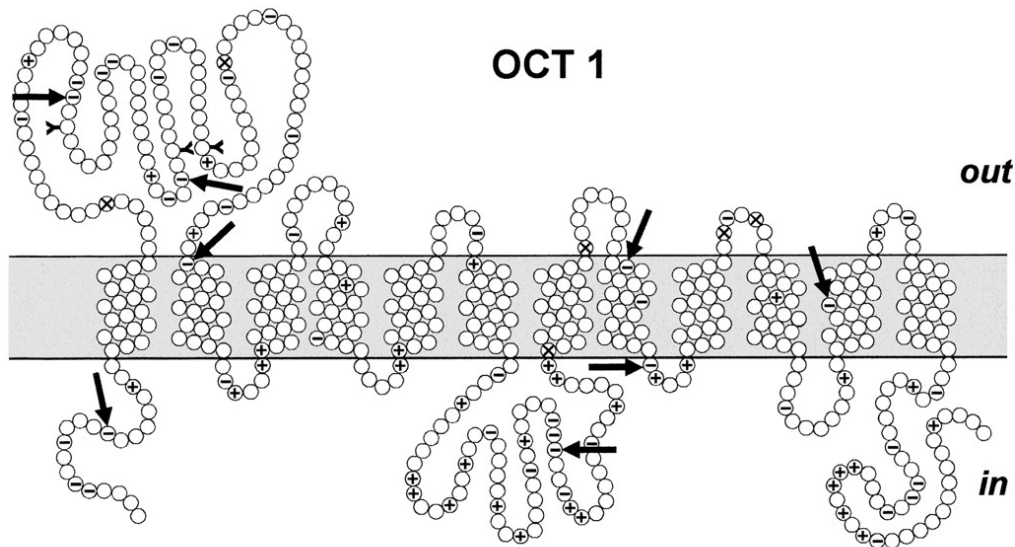


Abbildung 8: Model des rOct1

Grau schattiert, Plasmamembran; Y, potenzielle N-Glykosilierungsstellen; ○, Aminosäuren; ⊖, Aminosäuren Asparaginsäure oder Glutaminsäure; ⊕, Aminosäuren Lysin oder Arginin; ⊗, an Wasserstoffrest; Pfeile, konservierte negativ geladene Aminosäuren innerhalb der OCT-Familie (Burckhardt and Wolff 2000)

Auch wenn der Aufbau und die Translokation der drei Isoformen ähnlich sind, so unterscheidet sich die Verteilung in den Organen erheblich. OCT1 wird sehr stark in der Leber in der sinusoidalen Membran exprimiert (Gorboulev, Ulzheimer et al. 1997; Zhang, Dresser et al. 1997; Koepsell, Lips et al. 2007) und ist vermutlich für die Aufnahme von sowohl endogenen Substanzen als auch Xenobiotika aus dem Blut in die Leber verantwortlich. Damit kann OCT1 zur anschließenden hepatischen Metabolisierung und/oder biliären Exkretion beitragen.

OCT2 wird besonders in der Niere auf der basolateralen Seite der Epithelzellmembran des proximalen Tubulus exprimiert (Koepsell, Lips et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass in Oct2-Knock-Out-Mäusen, die zuvor mit dem bekanntermaßen nephrotoxischen Cisplatin behandelt wurden, eine verminderte Nephrotoxizität auftrat (Ciarimboli, Deuster et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten im Menschen bestätigt werden. In einer klinischen Studie (n=78) wurden Patienten mit dem Wildtyp-OCT2-Allel und der genetischen Variante 270Ala>Ser, von der bereits bekannt ist, dass sie zu einer verminderten Substrataufnahme führt, miteinander verglichen (Filipski, Mathijssen et al. 2009). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Träger dieser Variante eine verminderte Nephrotoxizität aufweisen. OCT2 soll auch im Gehirn exprimiert sein. Es konnte dargetan werden, dass es nennenswert im limbischen System exprimiert wird und es eine Korrelation zwischen Angstzuständen und Depressionen im Verhalten der Maus gibt (Bacq, Balasse et al. 2012). Die Oct2-knock-out-Mäuse weisen eine signi-

fikant verminderte Gehirnkonzentration von Noradrenalin und Serotonin auf. Außerdem führt eine Inhibition des OCT2 zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Serotonin und Noradrenalin im Forced-Schwimmtest¹ bei Mäusen. Diese Ergebnisse implizieren OCT2 als relevante postsynaptische Zielstruktur.

Im Gegensatz zu OCT1 und OCT2 verweist OCT3 eine breite Verteilung. So wird diese Isoform stark im Gehirn exprimiert, jedoch ist noch nicht klar, ob sie neuronal oder glial verteilt ist (Gasser, Orchinik et al. 2009). Es wird vermutet, dass OCT3 die einzige OCT-Isoform ist, die in der Plazenta exprimiert wird (Sata, Ohtani et al. 2005). Eine Aufnahme von Monoamineurotransmittern in Herz und Plazenta wird beschrieben (Urban, Yang et al. 2007). Deshalb wird der Transporter auch als Extraneuronaler Monoamintransporter bezeichnet (Amphoux, Vialou et al. 2006). In der Leber soll OCT3 ebenfalls wie OCT1 auf der sinusoidalen Seite exprimiert sein (Koepsell, Lips et al. 2007). Die Expression von OCT3 ist mehr als zehnmal niedriger als die OCT1 Expression (Nies, Koepsell et al. 2009).

1.3.2 Substrat- und Inhibitorspezifität der OCTs

Inzwischen sind viele Substanzen bekannt, die durch OCTs transportiert werden können (Koepsell, Lips et al. 2007). Charakteristisch ist, dass es sich hierbei um organische Kationen, meist schwache Basen mit einer positiven Ladung bei physiologischem pH-Wert, tendenziell hydrophil und mit einem niedrigeren Molekulargewicht handelt; in der Regel unter 500 g/mol (Koepsell, Lips et al. 2007). Beispielhaft sind die Modellsubstrate, die oft zur Charakterisierung der Funktionalität dieser Transporter verwendet werden, wie das Tetraethylammonium (TEA^+) oder das Neurotoxin Methylphenylpyridinium (MPP^+), aber auch endogene Substanzen wie die Prostaglandine (Koepsell, Lips et al. 2007). Einige OCT-Substrate scheinen auch bei physiologischem pH-Wert neutral oder sogar negativ geladen zu sein (Koepsell, Lips et al. 2007; Urban, Yang et al. 2007; Ahlin, Karlsson et al. 2008). Es sind auch Arzneistoffe bekannt, die sich durch eine Inhibition der OCTs auszeichnen. Charakteristisch hierfür sind eine hohe Lipophilie und eine positive Ladung, wohingegen ein Dipolmoment und die Affinität zur Bildung vieler Wasserstoffbrückenbindungen einen Transport nicht begünstigen (Ahlin, Karlsson et al. 2008). Bei Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Serotonin, Cholin, Acetylcholin und N-Methylcholin scheint es sich um solche Inhibitoren zu handeln (Nies,

¹ Der Forced-Schwimmtest (forced swimming test) ist ein Verhaltenstest, der die Wirkung von Antidepressiva auf Versuchstiere untersucht.

Koepsell et al. 2011). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass es viele klinisch relevanten Interaktionen zwischen den OCTs und Arzneistoffen wie Chinidin, Chinin (Zhang, Schaner et al. 1998), antiviralen Medikamenten wie Aciclovir (Takeda, Khamdang et al. 2002) und dem Antidiabetikum Metformin gibt (Koepsell 2004; Shu, Sheardown et al. 2007; Tzvetkov, Vormfelde et al. 2009; Nies, Hofmann et al. 2011). Es ist klar erkennbar, dass OCTs eine wichtige Rolle bei der Verteilung und Wirkung von Arzneistoffen spielen (Bednarczyk, Ekins et al. 2003; Ahlin, Karlsson et al. 2008). Eine Voraussage zu treffen, wie ein Substrat bzw. ein Inhibitor Isoform-spezifisch aussehen muss, ist nur schwer möglich, da es große Überlappungen gibt, dennoch wurden 244 OCT2-Inhibitoren (Kido, Matsson et al. 2011) und andere Isoform-spezifische Substrate publiziert (Koepsell, Schmitt et al. 2003). Neben Arzneistoffinteraktionen scheint auch die genetische Variabilität des OCT von klinischer Bedeutung zu sein.

1.3.3 Genetische Variationen in der SLC22A-Famile

Es ist bekannt, dass der menschliche OCT1 genetisch polymorph ist. Viele Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNPs) konnten im *SLC22A1* identifiziert werden. Einige führen zu einem Funktionsverlust oder einer verminderten Transportaktivität des OCT1: die Aminosäuredeletion Met420del und die Aminosäuresubstitutionen Arg61Cys, Cys88Arg, Gly401Ser, Gly465Arg, wobei Cys88Arg und Gly465Arg nur in Kombination mit Met420del auftreten (Kerb, Brinkmann et al. 2002; Shu, Leabman et al. 2003). Man weiß, dass insgesamt 9% der kaukasischen Bevölkerung homozygote Träger von mindestens einem dieser fünf Polymorphismen sind und eine reduzierte oder keine Aktivität des OCT1 haben (Shu, Sheardown et al. 2007; Tzvetkov, Vormfelde et al. 2009; Tzvetkov, Saadatmand et al. 2012). Klinische Studien ergaben, dass genetische Variationen des OCT1 zu einer verminderten Aufnahme von Metformin und somit zu einer geringeren Wirkung führten (Shu, Sheardown et al. 2007). Des Weiteren wurde dargestellt, dass diese Varianten zu erhöhten O-Desmethyltramadol-Spiegeln führen (Tzvetkov, Saadatmand et al. 2011) und somit die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen größer ist. Die Präsenz der Polymorphismen werde auch mit einer höheren Plasmakonzentrationen und einer verstärkten Wirkung von Tropisetron in Krebspatienten assoziiert (Tzvetkov, Saadatmand et al. 2012). Der Austausch der Aminosäuren soll durch eine Veränderung in der chemischen Struktur zu einer veränderten Substratselektivität des OCT1 führen, die mit einer verringerten Anheftung der Substrate an den OCT1 assoziiert wird. Alle aufge-

zählten Varianten traten an evolutionär konservierten Stellen auf (Kerb, Brinkmann et al. 2002; Urban, Yang et al. 2007).

Für den OCT2 ist nur eine häufig auftretende genetische Variante mit klinischer Relevanz bekannt: der Aminosäureaustausch 270Ala>Ser. Untersuchungen zeigten, dass diese Variante zu einem verminderten Transport endogener Substanzen wie Noradrenalin und Dopamin und Xenobiotika wie Propranolol und Metformin führt (Zolk, Solbach et al. 2009). Allerdings sind die *In-vitro*-Ergebnisse nicht immer eindeutig (Leabman, Huang et al. 2002; Zolk, Solbach et al. 2009).

Für den OCT3-Transporter sind einige Aminosäureaustausche bekannt, die vermutlich nicht von klinischer Relevanz sind.

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund der bereits erwähnten Strukturähnlichkeit zu Tramadol und O-Desmethyltramadol, sollte untersucht werden, ob es sich bei Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin um Substrate des OCT1 handelt. Des Weiteren sollten OCT2-überexprimierende Zellen generiert und charakterisiert werden und auch hier erforscht werden, ob Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin Substrate des OCT2-Transporters sind. Ferner sollte der Einfluss genetischer Varianten von OCT1 und OCT2 auf die zelluläre Aufnahme von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin erkundet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme	Lieferant/Hersteller
1 kb Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
100 bp Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
2-Mercaptoethanol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agar (für die Bakteriologie)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin min. 99%	AppliChem, Darmstadt
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BigDye® Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Borsäure 100%	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau, Na-Salz (für Elektrophorese)	Roth, Karlsruhe
Chloroform $\geq 99,8\%$	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diatriumhydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP Set	ABgene, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
EDTA 0,5 M in wässriger Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA, rein	Merck, Darmstadt
Endonuclease, DpnI	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt 99% (Desinfektionsmittel)	Chemie-Vertrieb, Hannover
Essigsäure 100%, pro analysis	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1% in H ₂ O (für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt
Exonuclease I E.coli (20u/μl)	Fermentas, St. Leon-Roth

Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
FuGene 6	Roche, Mannheim
Glycerin 85%	Zentralapotheke, Klinikum Göttingen
Genomics Millipore Kit	Millipore, Bedford, USA
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HBSS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Helipur® H plus N Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen
HotStarTaq Master Mix Kit (250 units)	Qiagen, Hilden
Hygromycin B (50mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Isoamylalkohol 98%	Schuchardt, Hohenbrunn
Isopropanol $\geq 99,9\%$	Merck, Darmstadt
KOD HotStart DNA Polymerase	Novagen Merck, Darmstadt
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ligate-IT™ Rapid Ligation Kit	usb, Staufen
Magnesiumchlorid $\geq 99\%$	Riedel-De Haën AG, Seelze
Magnesiumsulfat $\geq 99,5\%$	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen reinst.	Merck, Darmstadt
Neodisher® A 8, Reinigungspulver	Chem. Fabrik Dr. Weigert, Mühlenhagen
Nonidet®P40 Substitute (Nonylphenylethylenglycol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
O-Desmethylvenlafaxin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PAMPA-Platten	Gentest, BD Biosciences
PBS Pulver (Dulbeccos 10-fach)	AppliChem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Polylysin-D-hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PureYield™ Midiprep Kit	Promega, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

qPCR [®] Core Kit (RT-QP73-05)	Eurogentec, Köln
qPCR [®] Core Kit for SYBR [®] Green (RT-SN10-15)	Eurogentec, Köln
Random Hexanukleotid Primer <i>dN6</i>	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase Inhibitor (25200 U/ml)	USB, Staufen
RNase A ~70%	AppliChem, Darmstadt
RNase Zap	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti-Aqua [®] Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Sephadex [™] G-50 Superfine	Amersham Bioscience, Freiburg
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 u/μl)	usb, Staufen
Super Script II Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
TaqMan [®] Genexpressionsassay für OCT2	Applied Biosystem, Darmstadt
Tris 100%	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Venlafaxin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
50 ml Zentrifugenröhrchen	Beckman, München
96 Millipore MAHV N45 Platte	Millipore, Bedford, USA
96 Millipore MANU 030 PCR-Platte	Millipore, Bedford, USA
96er PCR-Platten	ABgene, Epsom
Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Epsom
Dialysefilter VSWP01300	Millipore, Bedford, USA
Elektroporationsküvetten 2 mm	PeqLab, Erlangen
Flat cap strips, 8er	ABgene, Epsom
Flat cap strips, 12er	ABgene, Epsom
FrameStar 384	4titude, Wotton
Glas Pasteur Pipetten 230 mm	WU, Mainz
Kulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten (UVetten) 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Lochplatte für Sephadex	Millipore, Schwalbach
Minisart 2000 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Minisart-plus 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Nunclo TM Multischalen 6 und 12 Well	Nunc, Wiesbaden
Absolute QPCR Seal (Optische Folie für Taqman)	Thermo Scientific
Parafilm [®]	Brand, Wertheim
Petrischalen	Sarstedt, Hamburg
Petrischalen für Zellkultur, Falcon 353003	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Hamburg
Quali-Filterpipettenspitzen steril	Kisker, Steinfurt
Rahmen und Septen für Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
Reagiergefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Hamburg
Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Hamburg
Sterile Polypropylen-Röhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen

Sterile Polypropylen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Hamburg
Thermo-Fast 384er Platten (PCR-Platten für Taqman)	ABgene Epsom
Thermo-Fast 96er Platten	ABgene, Epsom

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
CO2-Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau
ComPhor L Mini Gel-Kammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, Hercules USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluor-S™ MultiImager	BioRad, Hercules, USA
Gelkammer Ruby SE600	Hoefler, San Francisco, USA
HPLC-Anlage	Merck Hitachi, Darmstadt
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKAMAG, Staufen
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Microskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
MS 2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
Nanotropeküvette	Implen
Neubauer-Zählkammer	Schütt, Göttingen
PTC-200 Peltier Thermal Gradient Cycler	MJ Research/BioRad, Hercules, USA

QiaCube	Qiagen, Hilden
Transilluminator TI 2	Biometra
Schüttler für Bakterien K2 260 basic	IKA, Staufen
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg
Stereomikroskop Stemi 1000	Zeiss, Jena
TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Tecan Ultra	Männedorf, Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Zentrifuge JA-20 Rotor	Beckman, München

2.1.4 Software

Software, Datenbanken und Sequenzen	Hersteller
3100 Data Collection Software	Applied Biosystems
Clone Manager Suite	SECentral
DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems
Endnote 9	Wintertree Software Inc.
GeneMapper, Version 3.7	Applied Biosystems
MS Office 2007	Microsoft, USA
National Center for Biotechnology Information	NCBI, Bethesda, USA
Quantity One S	Bio-Rad, München
SDS 2.1	Applied Biosystems
Sigma Plot	Systath, Erkrath
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA
Staden Package	SourceForge.net
XFluor4 Software	Tecan, Crailsheim

2.1.5 Plasmidvektoren

Vektoren	Verwendung	Resistenz	Bezug
pOG44	Rekombinasespender	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA5:FRT	Expressionsvektor	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
LacZ/Zeocin-Fusionsgen	Expressionsvektor	Zeocin	
prcCMV::hOCT2	Ausgangskonstrukt		

2.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Bezug
Flp-In TM TREx 293	Human	Embryonale Nierenzelllinie (Flp Recombination Target (FRT)-Stellen stabil im Genom integriert)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7 Bakterienstämme

Stamm	Verwendung	Bezug
Top10 (One shot TOP10 Electrocomp. E.coli), <i>Escherichia coli</i>	Für Transfektion als Elekt-ro-kompetent	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 DNA

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR)

Die PCR ist eine *In-vitro*-Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), die aus folgenden Teilschritten besteht:

Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und die beiden Stränge voneinander getrennt werden.

Annealing: In diesem Schritt wird die Reaktion herunter gekühlt, sodass die Primer sich an die DNA-Einzelstränge anlagern können. Diese Temperatur liegt meist 5–10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer.

Elongation: Die DNA-Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers. Der Primer bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs.

Diese Schritte werden abhängig vom Ziel der PCR 18 bis 35-mal wiederholt. Hauptsächlich wurde eine KOD-Hot-Start-DNA-Polymerase (Novagen, Darmstadt) verwendet, für längere DNA-Sequenzen bediente man sich des Expand-Long-Template-PCR-Systems (Roche, Mannheim), das aus einem Mix aus Taq-DNA-Polymerase und Tgo-DNA-Polymerase besteht. Die PCR-Reaktionen wurden im Thermo-Gardientencycler (Biorad, Hercules, USA) oder im Thermo-Mastercyclern (Eppendorf) durchgeführt.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt kann durch die Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Dabei werden Fäden aus Agarosepolymeren zu einem Gel vernetzt, wodurch es zu einer Porenbildung kommt. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren im Gel. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode. Es kommt zum sogenannten „Siebeffekt“; kleinere DNA-Moleküle können sich schneller durch die Poren des Gels bewegen, wodurch es zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe kommt. Dabei kann die Länge der einzelnen PCR-Produkte mithilfe einer Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe mitläuft, identifiziert werden.

Das Agarose-Gel wurde für die folgenden Versuche ausschließlich in einer Konzentration von 0,8% verwendet. Dazu werden 0,4 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Nachdem das Gel auf eine Temperatur von ca. 50°C herunter gekühlt ist, werden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) eingerührt. Anschließend wird die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Bildung von Taschen (ca. 5–10 mm vom Rand entfernt) auf einer Seite des Gels hineingesteckt.

Nach ca. 20 min sollte das Gel fest geworden sein und der Kamm entfernt werden.

Das Gel wird in 1 × TBE-Laufpuffer, der durch Verdünnung eines 5 x TBE-Puffer hergestellt wurde, mit Ethidiumbromid gelegt, wobei dieses vollständig durch den Puffer bedeckt sein muss. Zum Identifizieren von DNA werden zur 10 µl Probe 2 µl Probenpuffer mit Farbmär-

ker gegeben. Ist eine spätere Isolation der DNA vorgesehen, werden auf 50 µl Probe 10 µl Probenpuffer mit Farbmarker gegeben, wobei hier die Taschen doppelt so groß sein sollten.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V und für 30 min in einer ComPhor Mini Gelkammer (Biozym). Es wurde abhängig von der Größe der DNA-Fragmente sowohl 1-kb-Leiter als auch 100-bp-Leiter (ABgene, Fermentas) verwendet. In einem Fluor-STM MultiImager (BioRad, Hercules, USA) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht und mithilfe der Software QuantityOne® S Version 4.3.1 (Biorad) analysiert werden.

5 x TBE-Puffer (pH 8,3)

Substanz	Endkonzentration
Tris	0,1 M
Borsäure	0,1 M
EDTA	3,0 mM

Probepuffer mit Farbmarker

Substanz	Endkonzentration
Glycerol	30% (v/v)
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,25% (v/v)
Xylencynalol	0,25% (v/v)

2.2.1.3 Quantifizierung

Zum Quantifizieren von DNA wird das Absorptionsmaximum bei 260 nm genutzt. Dazu werden 3 µl DNA auf eine Implen-Nanodrop-Küvette pipettiert und im BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Grundlage der Messung ist das Lambert-Beer'sche-Gesetz:

$$A = \epsilon_{\lambda} \times c \times b ,$$

wobei

A die Extinktion des Materials für Licht der Wellenlänge λ ,

ϵ_{λ} der spektrale Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ ,

c die Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (Einheit: $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und

b die Schichtdicke der Küvette ist (hier 1 cm).

Plasmid-DNA kann mit Proteinen verunreinigt sein. Da DNA und Proteine Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen aufweisen, können sie photometrisch unterschieden werden. Während DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweist, liegt das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm. DNA-Proben mit einem 260-280-Quotienten über 1,6 werden als ausreichend rein angesehen.

2.2.1.4 DNA-Isolation

2.2.1.4.1 Isolation von genomischer DNA aus Zellen

Zur Isolation von genomischer DNA aus Zellen wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen, Eppendorf) laut Protokoll verwendet. Die automatische Extraktion erfolgt im QIAcube Roboter (Qiagen, Eppendorf). Dazu werden 1×10^6 Zellen lysiert, anschließend über Säulen gereinigt und die gewonnene DNA in 50 μl Elutionspuffer gefällt.

2.2.1.4.2 DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Nach einer Agarose-Gelelektrophorese in präparativen Mengen konnte das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mithilfe des Transilluminators T12 (Biometra) aus dem Gel herausgeschnitten werden. Anschließend wurde mithilfe des QIAcube Roboters (QIAGEN) und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) und dem dazugehörigen Protokoll die DNA in 50 μl Elutionspuffer isoliert.

2.2.1.4.3 Enzymatische Aufreinigung von genomischer DNA

Die PCR-Produkte (20 μl) für die Sequenzanalyse wurden gereinigt und enzymatisch aufbereitet. Dazu unterzog man sie einem Exonuklease-und-Shrimp-Alkaline-Phosphatase-(SAP-)Verdau. Dabei dient das SAP dem Entfernen von Nukleotiden, während die ExonucleaseI von *E. coli* die Primer entfernt. Jeweils 3 μl des Exo-SAP-Gemischs werden zu 11 μl PCR-Produkt gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend werden bei 80°C für 15 min im Thermocycler (Biorad, Hercules, USA) die Enzy-

me inaktiviert. Zur Überprüfung der PCR können zuvor 9 der 20 µl PCR-Produkt aufgetragen werden.

SAP-Verdau	Volumen
rSAP (1 U/µl)	2,5 µl
ExoI (10 U/µl)	0,3 µl
10 x rSAP-Puffer	0,9 µl

2.2.1.5 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau wird DNA an gezielten Stellen gespalten. Beim analytischen Restriktionsverdau dienen die Spaltprodukte zur Überprüfung der eingesetzten DNA; beim präparativen Restriktionsverdau setzt man die Spaltprodukte für Klonierungen ein.

Die Reaktionsbedingungen (Puffer, BSA-Menge, Temperatur) der Restriktionsendonukleasen werden den entsprechenden Katalogen (NEB, Promega) entnommen.

2.2.1.5.1 Analytischer Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wird ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl mit folgenden Reaktionsbedingungen gewählt:

Analytischer Restriktionsverdau	Volumen
Plasmid	1 µl
Puffer	1 µl
Enzym	1 µl
ddH ₂ O	7 µl

Inkubation: 10 min bei 37 °C

2.2.1.5.2 Präparativer Restriktionsverdau

Bei einem präparativen Restriktionsverdau beträgt das Gesamtvolumen 50 µl, wobei die Reaktionsbedingungen unverändert blieben.

Die Plasmid-DNA sollte zuvor mittels Dialyse von Salzrückständen befreit werden.

Präparativer Restriktionsverdau	Volumen
Plasmid	43 µl
Puffer	5 µl
Enzym I	1 µl
Enzym II	1 µl

Inkubation: 10 min bei 37°C

2.2.1.6 Ligation

Bei der Ligation werden enzymkatalysiert DNA-Fragmente miteinander verbunden. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende mithilfe des Enzyms Ligase durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden.

Angewendet wird die Ligation beim Klonieren. DNA wird dabei in ein zuvor mit Restriktionsenzymen geschnittenes und linearisiertes Plasmid eingebracht. Die ebenfalls lineare fremde DNA wird zusammen mit dem geschnittenen Plasmid und einer Ligase inkubiert, wobei die Enden jeweils miteinander verknüpft werden. Das einzubringende DNA-Fragment muss dazu im 14-fachen Überschuss vorliegen (V/V).

Die Ligation wurde mittels des Ligate-ITTM Rapid Ligation Kits (USB, Stauf, Germany) und dem dazugehörigen Protokoll durchgeführt.

Ligation	Volumen
5x Ligase-Puffer	4 µl
Plasmidvektor	1 µl
Einzubringendes DNAfragment	14 µl
Ligase	1 µl

Inkubation: 10 min bei Raumtemperatur

Zusätzlich wurde eine Negativ-Kontrolle mithilfe von ddH₂O anstelle von DNA durchgeführt. Anschließend wurde der Ligationsmix im SpeedVac Plus[®] SC110A Rotationsverdampfer (Schütt, Göttingen) mittels einer Membranvakuumpumpe bei 200 mbar (Vacuubrand, Wertheim) für 10 min auf 60% des ursprünglichen Volumens aufkonzentriert. An den Wänden der Reagiergefäße anhaftende DNA wurde anschließend herunterpipettiert.

2.2.1.7 Gezielte Mutagenese

Durch gerichteten Austausch von Basenpaaren in der DNA werden nicht zufallsgemäße Mutanten erzeugt. Hier wurde eine genetische Variante des OCT2 erzeugt, indem das Ausgangsplamid prcCMV::OCT2 mittels PCR amplifiziert wurde. Verwendet wurden das KOD Hot Start DNA Polymerase Kit (Novagen, Merck, Darmstadt) und gezielte Mutageneseprimer, wobei der Primer nicht zu 100% identisch ist mit der DNA, an die er sich anlagert. Während der Amplifikation wird so eine Mutation in das DNA-Fragment eingeführt.

Aminosäure- variante	Primersequenz
Wildtyp	5'-GAGGTGGTTGCAGTTCACAGTT <u>G</u> CTCTGCCCAACTCTTCTTCTT-3'
270Ala>Ser	5'-GAGGTGGTTGCAGTTCACAGTT <u>T</u> CTCTGCCCAACTCTTCTTCTT-3'

Um die optimale Temperatur für die Primerhybridisierung zu finden, wurde eine Gradienten-PCR mit fünf verschiedenen Annealing-Temperaturen (50,0°; 53,2°; 58,4°; 64,4°C) in einem Gradientencycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) für eine Probe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Gezielte-Mutagenese-PCR		Volumen
10 x Puffer		2 µl
dNTPs (2 mM)		2 µl
MgSO ₄ (25 mM)		0,8 µl
Q-Solution		4 µl
Forward-Primer (10 µM)		0,5 µl
Reverse-Primer (10 µM)		0,5 µl
Template DNA (50 ng/µl)		0,4 µl
KOD Hot Start Polymerase 1.0 U/µl)		0,4 µl
ddH ₂ O		9,4 µl

95°C	3 min	
95°C	30 sec	19 x
50°-70°C	30 sec	
68°C	2 min 30 sec	
8°C	forever	

Mit Auftragen auf ein Agarosegel konnte das Temperaturoptimum bestimmt werden. Anschließend wurde die PCR mit demselben Ansatz bei einem Temperaturoptimum von 55°C für alle Proben durchgeführt.

Um die nicht mutierte DNA zu entfernen, erfolgte ein Verdau, wobei die Endonuclease Dpn I (NEBiolabs, Frankfurt am Main) ein bakterienspezifisches Methylierungsmuster bei der nicht mutierten DNA erkennt und diese verdaut, wodurch nur noch DNA mit der Mutation zurückbleibt:

Endonuclease-Verdau		Volumen
PCR-Produkt		20 µl
DpnI		2 µl

Inkubation: 1-2 h bei 37°C

Anschließend wird die DNA für 30 min dialysiert, um sie dann in *E. coli* mithilfe Elektroporation (s. 2.2.4.3) einzubringen. Die Überprüfung erfolgte durch Sequenzierung (s. 2.2.1.9) nach DNA-Isolierung aus dem Bakterium mittels Mini-Präparation (s. 2.2.4.4.1).

2.2.1.8 PCR für chromosomale Integration

Um die chromosomale Integration des OCT2 in den pcDNA5 Vektor zu untersuchen, konnte man sich zweier spezifischer PCR bedienen. Nach Isolation der DNA mittels DNeasy® blood and tissue Kit unter Verwendung des QIAcube Roboters (Qiagen, Hilden) konnten zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt werden. Die erste PCR zeigt die Integration der Promoterregion für die Hygromycinresistenz. Die auf dem Plasmid codierte Resistenz gegen Hygromycin sollte sich nach der Integration unmittelbar nach der SV40-Promotor-Region befinden. Das Start-Codon bildet nun den Beginn der Hygromycin-Resistenz. Diese Region kann in Form einer PCR untersucht werden, wobei folgende Primer beteiligt sind:

Primer	Sequenz
PSV40-f	5'-AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG-3'
Hyg-r	5'-ACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAA-3'

1. PCR	Volumen
10 x Puffer	2 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
MgSO ₄ (25 mM)	0,8 µl
Q-Solution	4 µl
Forward-Primer PSV40 (10 µM)	0,5 µl
Reverse-Primer Hyg (10 µM)	0,5 µl
DNA	1 µl
KOD Hot Start Polymerase (1.0 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	9,7 µl

95°C	2 min	35 x Zyklen
95°C	30 sec	
68°C	30 sec	
72°C	1 min 30 sec	
8°C	for ever	

Bei der zweiten PCR wird die Integration des OCT2-Gens untersucht, das sich nun unmittelbar vor der PCMV-Region befindet. Die Lac/Zeocin-Resistenz liegt durch die Integration erst nach dem OCT2-Gen und wird für den Rückwärts-Primer verwendet.

Primer	Sequenz
P _{CMV}	5'-CCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA-3'
Lac	5'-CCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAA-3'

2. PCR	Volumen
10 x Expand-Long Puffer 1	2,6 µl
dNTPs (2 mM)	4,5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	0,8 µl
Forward-Primer LacZ (10 µM)	0,5 µl
Reverse-Primer P _{CMV} (10 µM)	0,5 µl
DNA	2 µl
Expand Long DNA Polymerase Mix (1.0 U/µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	14,95 µl

94°C	2 min	35 x Zyklen
96°C	30 sec	
57°C	30 sec	
68°C	1 min 30 sec	
68°C	7 min	
8°C	forever	

2.2.1.9 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung der DNA-Fragmente wird die Didesoxymethode nach Sanger verwendet. Sie wurde von Sanger und Coulson um 1975 entwickelt. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert, woraufhin Einzelstränge für das weitere Vorgehen zur Verfügung stehen. Die vier Nukleotide werden als Didesoxynukleosidtriphosphate zugegeben (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP). Diese ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe und führen bei Einbau in einen neusynthetisierten Strang zu einem Abbruch der Verlängerung durch die DNA-Polymerase, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Dadurch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit differenzierten ddNTPs enden. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Das Chromatogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Für den Ansatz wurde das BigDye[®] terminator v 1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) benutzt.

Sequenzierungs-PCR	Volumen
ddH ₂ O	2,25 µl
DMSO	0,25 µl
Primer	0,5 µl
Big Dye	1 µl
PCR-Produkt	1 µl

94°C	2 min	25 x Zyklen
96°C	15 sec	
56,5°C	15 sec	
60°C	4 min	
72°C	7 min	
8°C	forever	

Aufgrund der Länge des OCT2-Gens wurden fünf verschiedene Primer ausgewählt:

Primer	Sequenz
OCT2_seq1_f	5'-CGCCCATCTACGTGGGCATCGTCTT-3'
OCT2_seq2_r	5'-ATGGACGAGCCAGGCGTCTCGTACA-3'
OCT2_seq3_f	5'-GCTTAATCCAAGGACTGGTCAGCAA-3'
OCT2_seq4_f	5'-CCCTTGGGCTGCATCAAATATGGTT-3'
OCT2_seq5_r	5'-TGATCCCCATTCTTCCCAAGCATGA-3'

Um das Sequenzierungs-PCR-Produkt von überschüssigen Salzen und restlichen ddNTPs aufzureinigen, wurde eine Big-Dye-Terminator-Abtrennung über Sephadexsäulen durchgeführt. Die Sephadexplatte wurde zuvor mit Sephadex G50 superfine (Amersham, Freiburg) nach Angaben des Herstellers vorbereitet und auch die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll.

Das aufgereinigte Sequenzierprodukt wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert und konnte anschließend in einem 3130x1 Genetic Analyser (Applied Biosystems) analysiert werden. Zum Auswerten bediente man sich der Software Sequencing Analysis Version 5.2 (Applied Biosystems) und Staden Package Version 4.0 (SourceForge.net).

2.2.2 RNA

2.2.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Eppendorf) verwendet. Es wurden 1×10^6 Zellen geerntet. Nach Absaugen des Mediums wurden sie in 350 µl RLT-Puffer (mit 10 µl/ml Mercaptoethanol) suspendiert. In diesem Zustand konnten die Zellen kurzfristig bei -20°C bzw. langfristig bei -80°C gelagert werden.

Das Zelllysat wurde für 3 min in einer Microzentrifuge zentrifugiert und anschließend in ein 2-ml-Reagiergefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Pellet nicht mitpipettiert wird. Das Lysat wurde unter Anwendung des Protokolls „Purification of total RNA from easy-to-lyse animal tissues and cells“ im QIAcube Roboter (Qiagen, Eppendorf) aufbereitet und die RNA isoliert. Die isolierte RNA wird in 50 µl Elutionspuffer gefällt.

2.2.2.2 RT-PCR (Real-time-PCR)

Durch das Umschreiben der isolierten RNA in copy bzw. complementary DNA (cDNA) kann die relative m-RNA-Menge bzw. die Expressionsrate dieses Gens mittels qPCR bestimmt werden.

Um cDNA zu erzeugen, bediente man sich der reversen Transkription. Eine RNA-abhängige Polymerase, die natürlich vorkommende Reverse Transkriptase, synthetisiert anhand einer RNA-Matrize den dazugehörigen komplementären cDNA-Strang. Dazu werden 1 µg RNA in 17,5 µl ddH₂O verdünnt. Als Primer wurde ein unspezifisches Hexanucleotid dN6 (Roche, Mannheim) dazugegeben und die Mischung für 10 min bei 70°C erhitzt. Dadurch erreicht man eine Denaturierung möglicher RNA-Sekundärstrukturen. Nach diesem Schritt wurde der Ansatz auf Raumtemperatur herunter gekühlt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wird der Master-Mix für die reverse Transkription zusammenpipettiert. Je 11,5 µl des Mastermix werden zum RNA-Primer-Ansatz hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 42°C. Die fertig synthetisierte c-DNA wurde mit jeweils 70 µl Wasser aufgefüllt und konnte entweder gleich weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Zusammensetzung des Reverse-Transkriptase-Mastermix	Volumen
5 x Superscript RT Puffer	6 µl
DTT (0,1 M)	3,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
RNase Inhibitor (25,200 U/ml)	1 µl
Super Script™ II (200 U/µl)	0,25 µl

2.2.2.3 Real-time-quantitative-PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR (qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für DNA, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und gleichzeitig die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt hier unter Zuhilfenahme der sogenannten TaqMan-Sonden. TaqMan-Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (hier FAM, Carboxyfluorescein) markiert und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül gekoppelt, das durch strahlungsfreie Energieübertragung das Fluorophor unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des jeweiligen PCR-Produktes zu. Am Ende eines Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung ausschließlich in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen, um im linearen Bereich zu messen und nur so eine korrekte Quantifizierung gewährleistet ist. Beim Schwellenwert, dem sogenannten Threshold Cycle (Ct), handelt es sich um den PCR-Zyklus, bei dem ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals gegenüber der Hintergrundfluoreszenz erfolgt. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Konzentration der Transkripte. Dadurch lässt sich die relative Expression mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(\text{Ct}-\text{Ct NGen}) - (\text{CtKontrolle} - \text{Ct NGen Kontrolle})} = 2^{-[\Delta\Delta\text{Ct}]}$$

Für die Bestimmung der relativen Transkriptionsmenge von OCT2 wurde ein fertiges Assay von Applied Biosystem verwendet. Dieses enthält sowohl Primer als auch Sonden. Für die anderen PCR-Komponenten nutzt man einen Mastermix (Eurogentec).

Zusammensetzung 2xMastermix (Eurogentec)	Volumen
10 x Puffer	1,8 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,26 µl
dNTPs (5 mM)	0,72 µl
Hot Goldstar Polymerase (5 U/µl)	0,09 µl
ddH ₂ O	11,13 µl

Aus Assay-Mix und Mastermix wurde ein TaqMan[®]-Mastermix hergestellt.

TaqMan[®]-Mastermix	Volumen
2 x Mastermix (Eurogentec)	9 µl
20 x Assay Mix	0,9 µl
ddH ₂ O	5,1 µl

10 µl des TaqMan[®]-Mastermix und 3 µl cDNA werden in ein Well einer 384-Well-Platte pipettiert, Thermo Fast Plate 384, (ABgene) vorgelegt. In jedes Well werden 3 µl cDNA pipettiert. Alle Proben werden in Triplikaten vorbereitet. Die Platte wird mit einer adhäsiven PCR-Folie (ABgene) versiegelt, kurz abzentrifugiert und anschließend im Sequence Detection System 7900 HAT (Applied Biosystems, Darmstadt) vermessen.

PCR-Bedingungen:

95°C	2 min	40 x Zyklen
95°C	15 sec	
60°C	15 sec	
72°C	4 min	
8°C	forever	

Zur Auswertung wurde die Software SDS 2.1 eingesetzt, die die Ct-Werte für jede Probe angibt. Um die Transkriptmenge der untersuchten Gene von den Transkripten der Gesamt-RNA abzugrenzen, ist eine Normierung durch eine interne Kontrolle durchzuführen. Dazu benutzt

man ein house-keeping-gene, dessen Expression unabhängig vom Zellzyklus ist. Hier wurde das TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) verwendet.

2.2.3 Protein-Analyse

2.2.3.1 Proteinquantifizierung

Zur Quantifizierung des Proteingehalts einer Lösung bedient man sich der BCA-Reaktion. Zweiwertige Kupferionen reagieren zunächst quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese ergeben mit BCA (Bicinchoninsäure) einen violetten Cu^+ -Bicinchoninsäure-Komplex, der sich anschließend photometrisch quantifizieren lässt.

Praktisch wird wie folgt vorgegangen: Jeweils 10 μl der zuvor in RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer) gelösten Proteine werden in die Wells einer transparenten 96-Well-Platte (Sarstedt), möglichst ohne genomische DNA, pipettiert. Zum Erstellen einer Standardkurve werden verschiedene Volumina (1; 5; 10; 15; 20 μL) einer BSA-Lösung (1mg/ml) in die verbliebenen Wells pipettiert. Anschließend werden in jedes Well 200 μl der BCA-Kupferlösung hinzu pipettiert (50:1, frisch hergestellt). Es empfiehlt sich, sowohl die Proben als auch die Verdünnungen für die Standardkurve in Quadruplikaten zu vermessen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C können die Platten im Photometer (Tecan Ultra) bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen werden. Mithilfe der Standardkurve ist nun die Berechnung der Proteinkonzentration möglich.

RIPA-Puffer	Konzentration
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1% (v/v)
Na-deoxycholate	0.25 % (w/v)

BSA-Stammlösung (1mg/ml)	Menge
BSA	50 mg
RIPA-Puffer	50 ml

4%ige Kupfersulfat-Lösung (CuSO₄ x 5 H₂O)	Menge
Kupfersulfat	2 mg
ddH ₂ O	50 ml

2.2.4 Bakterienkulturen

2.2.4.1 Medium und Wachstumsbedingungen

LB (engl. lysogeny broth) ist ein komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien.

Zusammensetzung des LB-Mediums:

LB-Medium	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

20 min bei 120°C autoklavieren

Für Plattenkulturen wird vor dem Autoklavieren 14 g/l Agar (AppliChem, Darmstadt) zugegeben. Danach wird das Agar-Medium auf 60°C herunter gekühlt, in 92-mm-Petrischalen gegossen und man lässt es bis zum Festwerden erkalten. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei 4°C.

Wahlweise konnte sowohl zum LB-Medium als auch zum Agar-LB-Medium nach dem Abkühlen auf 60°C vorher steril filtriertes Antibiotikum hinzugegeben werden. Hier wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet. Die Bakterienstämme konnten sowohl auf Agarplatten als auch in 100 ml flüssigem LB-Medium in zuvor autoklavierten 500 ml Glasflaschen (für Midi-Prep, s. u.) oder in 5 ml flüssigen LB-Medium in 15 ml Falcons (für Mini-Prep, s. u.) kultiviert werden.

2.2.4.2 Lagerung von Bakterienstämmen

Die klonierten Bakterien wurden in einer 25%igen-Glycerol-Lösung bei -80°C gelagert. Dazu wurden 600 µl frisch und über Nacht kultivierte Bakterien zu 600 µl einer 50%igen Glycerol-Lösung gegeben, in ein 1,5-ml-Reagiergefäß überführt und sofort auf -80°C gebracht.

2.2.4.3 Elektroporation

E. coli-Zellen nehmen nach Elektroporation DNA auf. Die Reaktion muss so geleitet werden, dass eine Bakterienzelle möglichst nur ein DNA-Molekül erhält, das heißt, dass die Bakterienzellen im Überschuss vorliegen müssen. Ein kurzer elektrischer Impuls erzeugt Poren in der Cytoplasmamembran. Durch diese Öffnungen kann DNA in die Zelle eindringen.

Die elektrokompenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert, bevor der Ansatz dann in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten (ebenfalls auf Eis) pipettiert wird. Für die Elektroporation muss die Küvette gut abgetrocknet werden. Die Pulsdaten betragen für *E. coli* und den angewendeten Gene Oulser II (BioRad, Hercules, USA) 25 µF, 200 Ohm, 2,4 kV.

Ansatz Elektroporation	Volumen
<i>E. coli</i>	10 µl
ddH ₂ O	30 µl
DANN	3 µl

Nach dem Puls (5 msec) werden 800 µl bereits zuvor aufgewärmtes LB-Medium zu den Bakterienzellen hinzugegeben, der Ansatz wird in ein Reagiergefäß überführt und bei 37°C inkubiert. Nach einer Regenerationsphase von ca. 1 h können die transformierten Zellen auf Agarplatten mit verschiedenen Volumina ausgestrichen (50 µl, 100 µl, 200 µl) und anschließend im Inkubator kultiviert werden.

Nach 12 h können die entstandenen Klone einzeln mithilfe einer Pipettenspitze in unterschiedliche 15-ml-Falcon-Röhrchen mit jeweils 5 ml Medium und 10 µl Ampicillin überführt werden. Die Falcon-Röhrchen können in einem Schüttler aufgestellt (45-Winkel) und bei 37°C inkubiert werden, sodass sich die Klone ausreichend zum Durchführen einer Mini- bzw. Midi-Präparation vermehren.

2.2.4.4 Plasmidpräparation

2.2.4.4.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation dient der Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien in kleineren Mengen (ausgehend von 5 ml Flüssigkeitsmedium). Die Minipräparation erfolgt unter alkalischer Lyse. Die über Nacht kultivierten Bakterien mit dem Plasmid werden für 10 min bei 4000 rpm (*Eppendorf-Centrifuge 5810 R, Eppendorf*) abzentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 250 µl Resuspensionspuffer (Puffer 1) resuspendiert und in ein 1,5-ml-Reagiergefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µl einer Lösung von SDS und Natriumhydroxid (Puffer 2) und kräftigem Schütteln werden die Zellen alkalisch lysiert. Die Zugabe von 250 µl Eisessig und einer Kaliumacetat-Lösung (Puffer 3) bewirkt eine Neutralisation und mithilfe des in Puffer 2 enthaltenen SDS, dass die Proteine und die genomische DNA ausgefällt werden. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min (*Biofuge, pico, Heraeus, Hanau*) wird die Plasmid-DNA einer Reinigung durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Dazu gibt man 500 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1 v/v) hinzu und zentrifugiert bei 13000 rpm für 5 min (*Biofuge pico, Heraeus, Hanau*) ab. Es entstehen drei Phasen, wobei es sich bei der oberen um DNA im Puffer, bei der mittleren um Proteine in Isoamylalkohol und bei der unteren Phase um Chloroform handelt. Die obere Phase wird in ein Reagiergefäß überführt und jeweils 650 µl Isopropanol (-20°C) pro Probe zugegeben. Anschließend wird ein weiteres Mal für 15 min bei 4°C und 13000 rpm (*Biofuge, pico, Heraeus, Hanau*) abzentrifugiert und der Puffer verworfen. Das Pellet wird durch Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol (-20°C) und anschließendem Abzentrifugieren für 8 min bei 4°C und 13000 rpm (*Biofuge, pico, Heraeus, Hanau*) gewaschen. Das Ethanol wird verworfen. Die Reagiergefäße werden geöffnet auf 37°C in einen Thermomixer getrocknet. Sobald die DNA klar wird, gibt man 50 µl zu jeder Probe und schüttelt weitere 10 min im Thermomixer. Die isolierte Plasmid-DNA kann anschließend qualifiziert und quantifiziert werden.

Resuspensionspuffer (Puffer 1)	Konzentration
Tris-HCl (pH 8,0)	150 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

Lysepuffer (Puffer 2)	Konzentration
NaOH	200 mM
SDS	1% (m/V)

Resuspensionspuffer (Puffer 3)	Konzentration
Kaliumacetat (pH 5,5)	3 M

2.2.4.4.2 Midi-Präparation

Die Midi-Präparation dient der Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien in größeren Mengen (ausgehend von 25–100 ml Flüssigkeitsmedium). Dazu wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim) benutzt. Die Methode beruht auf Trennung der Plasmid-DNA von anderen Zellbestandteilen durch Anionenaustauschersäulen. Von den für 5 h im 5 ml LB-Medium (mit 10 µl Ampicillin versetzt) vorkultivierten Bakterien werden 10 µl entnommen und im 100 ml LB-Medium (mit 200 µl Ampicillin versetzt) in einer vorher autoklavierten 500-ml-Flasche über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag werden die Kulturen auf zwei 50-ml-Falconröhrchen verteilt und bei 5000 g und Raumtemperatur für 7 min abzentrifugiert (Centrifuge 5801 R, Eppendorf). Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 3 ml Resuspensionslösung suspendiert und in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (Beckman, München) überführt. Man gibt 3 ml Zelllyse-Lösung hinzu und mischt vorsichtig durch fünfmaliges Invertieren. Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit werden 5 ml Neutralisationslösung hinzugegeben, wieder fünfmal invertiert und weitere 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zelltrümmer und Proteine werden durch Zentrifugieren in einer Ultrazentrifuge (J2-21 M/E Zentrifuge, JA-20-Rotor, Beckmann) für 10 min bei 15000 g und Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wird die DNA mittels Vakuum aufgereinigt. Dazu baut man nach Angaben des Herstellers die Säulenkombination bestehend aus weißer Säule (Binding Column) und blauer Säule (Clearing Column) auf die Vakuumstation. Das Lysat

wird in die Säule gegossen und ein Vakuum erzeugt, bis das Lysat vollständig durch die Säule gelaufen ist. Die blaue Säule kann verworfen werden, während die weiße auf der Vakuumstation verbleibt. Es folgen die einzelnen Waschschrirte. Es werden erst 5 ml Endotoxin-Entfernungs-Waschlösung und dann 20 ml Säulen-Waschlösung durch die Säule gesaugt und zum Schluss erneut ein Vakuum für 60 Sekunden angelegt. Die weiße Säule wird von der Vakuumstation abgenommen und in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen gesteckt. Es wird 600 µl auf 50–70°C erhitztes Wasser auf die weiße Säule pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend zentrifugiert man bei 2500 g für 5 min. Man erhält 400 µl sauberes Eluat, welches auf Eis gestellt wird.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Verwendete Zellen und Kultivierungsbedingungen

Bei den Flp-InTM T-RExTM-293-Wirts-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie der menschlichen embryonalen Nierenzellen HEK 293. Sie zeichnet sich durch eine im Genom integrierte Flp-Rekombinase-Zielstruktur aus, die eine stabile Transfektion von Genen mithilfe des Flp-InTM-Systems (Invitrogen, Darmstadt) ermöglicht.

Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco), das mit 10% Fetal Bovine Serum und 1% Penicillin und Streptomycin versetzt wird, bei 37°C (5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80–90% werden die Zellen im Verhältnis 1:5 in eine neue Zellkulturlasche (75 cm² bzw. 25 cm²) durch Auf- und Abpipettieren gesplittet und dabei das Medium gewechselt. Dies erfolgt alle 3 bis 4 Tage.

2.2.5.2 Lichtmikroskopische Dokumentation

Die Beobachtung der kultivierten Zellen erfolgte täglich an einem Lichtmikroskop oder bei fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung mit einer UV-Lampe.

2.2.5.3 Zellzahl bestimmen

Die Zellzahlbestimmungen wurden in einer mit einem Deckglas verschlossenen Neubauer-Zählkammer (0,0225 mm² Fläche bei einer Tiefe von 0,1 mm) unter einem Mikroskop durchgeführt. Dazu wurden 20 µl der im Medium suspendierten Zellen mit 20 µl Trypanblau ver-

setzt, gut gemischt und auf das Deckglas pipettiert. Anschließend konnten die eingefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop gezählt werden.

2.2.5.4 Zellen ausplattieren

Für das Ausplattieren der Zellen (zur Vorbereitung von Transportexperimenten, s. u.) erfolgte zuvor deren Trypsinierung. Dazu wurde das Medium aus der Flasche gesaugt und die Zellen mit 3,5 ml Trypsin (TrypLE™ Express, Gibco/Invitrogen) versetzt und für 6 min bei 37°C inkubiert. Anschließend gab man 10 ml Medium hinzu, entnahm die Zellen durch Auf- und Abpipettieren im Medium in ein 15-ml-Falconröhrchen und zentrifugierte diese für 3 min bei 300 g und Raumtemperatur ab. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und die erforderliche Zellzahl ausplattiert. Abhängig vom Versuch wurden die Platten zum besseren Anhaften der Zellen mit Poly-D-Lysin beschichtet. Dazu inkubierte man die Platte für 10 bis 15 min mit einer wässrigen Poly-D-Lysin-Lösung (2 mg/100 ml) bei 37°C. Das Poly-D-Lysin wurde abgesaugt und die Platten unter der Sterilbank getrocknet.

2.2.5.5 Zellen einfrieren

Durch das Aufbewahren von Zellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff ist es möglich, die Vitalität der Zellen nahezu unbegrenzt aufrechtzuerhalten. Dazu wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen (75 cm²) bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert und anschließend in ein 50-ml-Falconröhrchen pipettiert. Durch Zentrifugation für 3 min bei 300 g und Raumtemperatur werden die Zellen überführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 8 ml eiskaltem Einfriermedium (90% Fetal Bovine Serum und 10% Dimethylsulfoxid) suspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 1,8 ml in 2-ml-Kryoröhrchen (Nunc, Thermo, Scientific, Dänemark) aliquotiert und für 1 h auf Eis gelegt. Anschließend lagerten die Zellen für eine Woche bei -80°C, bis man sie in flüssigem Stickstoff (-170°C) aufbewahren konnte.

2.2.5.6 Zellen auftauen

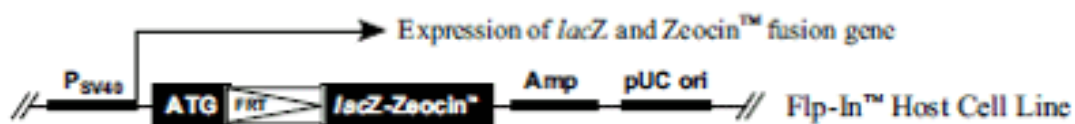
Zum Auftauen von Zellen wird mit 10% Fetal Bovine Serum und 1% Penicillin und Streptomycin versetztes Dulbecco's Modified Eagle's Medium auf 37°C erwärmt. Jeweils 10 ml Medium werden in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen vorgelegt. Das aus dem Stickstofftank entnom-

mene und in den Händen angewärmte Aliquot wird in das Falconröhrchen überführt. Die Zellen werden durch Zentrifugieren für 3 min bei 300 g und Raumtemperatur (Heraeus Laborfuge 400 R) pelletiert. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen in 5 ml frischem Medium suspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) transferiert und dann wie oben beschrieben kultiviert.

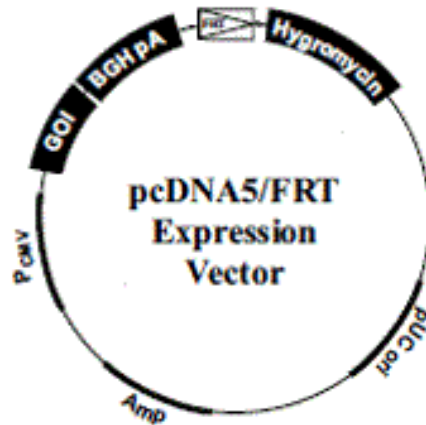
2.2.5.7 Stabile Transfektion mittels *Flp recombinase*

Mit Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom, die chromosomale Integration (stabile Transfektion).

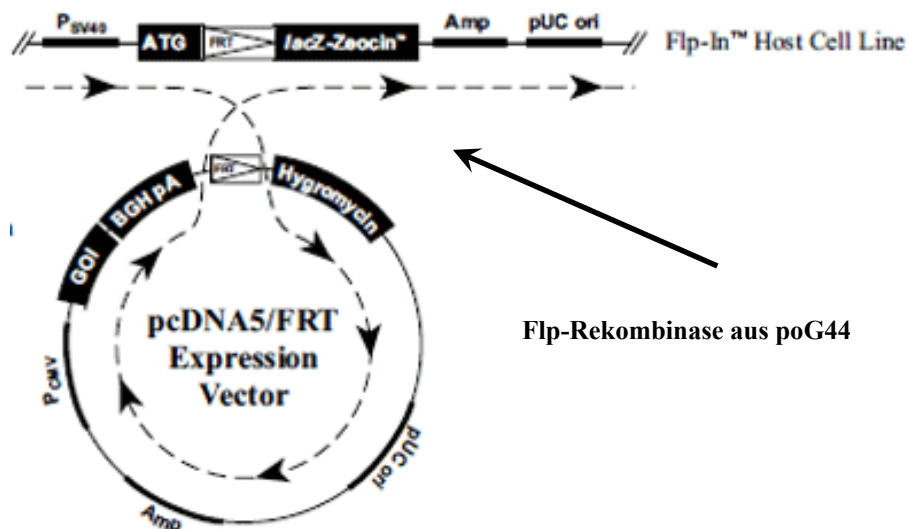
- 1) Zur Etablierung einer stabil mit OCT2-Transgen transfizierten Zelllinie wurde das Flp-In™-System benutzt, das bereits mit einem pFRT/lacZeo-Plasmid stabil transfiziert ist. Dieses Plasmid enthält ein Flp-Rekombinase Target (FRT), eine Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase. Diese Erkennungssequenz befindet sich direkt nach dem Start-Codon innerhalb der codierenden Sequenz für ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und dem die Zeocin-Resistenz bewirkenden Protein. Zellen des Flp-In™-Systems zeigen mit diesem Konstrukt β -Galactosidase-Aktivität und sind resistent gegen das Antibiotikum Zeocin.



- 2) Das gewünschte Transgen, hier OCT2, wurde zuvor (s. 2.2.1.6) in den eine FRT-Sequenz-enhaltenen pcDNA5-Expressionsvektor kloniert.

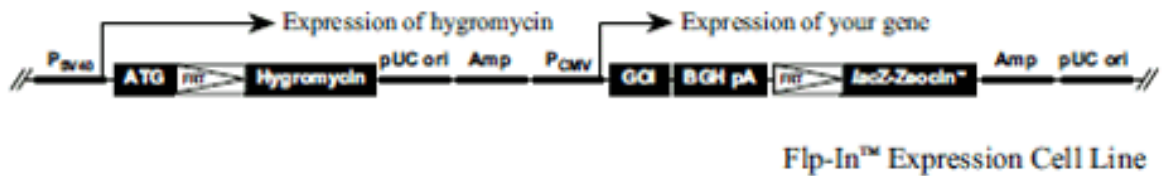


- 3) Gemeinsam mit dem die Flp-Rekombinase codierenden Plasmid pOG44 werden anschließend die oben beschriebenen Flp-In™-Zellen transfiziert. In den Zellen, die mit beiden Plasmiden transfiziert (pOG44 und pcDNA5::OCT2) wurden, erkennt die Flp-Rekombinase aus pOG44 die FRT-Sequenzen im pcDNA-5-Expressionsvektor und im Plasmid der zu transfizierenden Zelllinie und katalysiert zwischen diesen Stellen den DNA-Doppelstrang-Austausch.



- 4) Das Endprodukt lässt sich folgendermaßen beschreiben: Die auf dem Plasmid codierte Resistenz gegen Hygromycin befindet sich nun unmittelbar nach der SV40-Promotor-Region. Das Start-Codon bildet nun den Beginn des Proteins für die Hygromycin-Resistenz und kann nun abgelesen werden, wodurch eine Hygromycin-Resistenz zu-

stande kommt. Die LacZeocin-Resistenz hingegen geht verloren, da das OCT2-Gen unmittelbar vor der PCMV-Region integriert wird und die LacZeocin-Resistenz erst nach dem OCT2-Gen liegt. Die Zellen sind somit Zeocin-sensitiv, jedoch Hygromycin-resistent.



Um ein solches Konstrukt zu erhalten, geht man folgendermaßen vor:

9×10^5 - 10^6 Zellen werden in ein Well einer zuvor mit Poly-D-Lysin-beschichteten 6-Well-Platte ausplattiert.

Nach einem Tag sollten die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht haben. In einem 1,5-ml-Reagiergefäß werden 100 µl DMEM und 12 µl FuGene6 pro Well gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation pipettiert man 3,6 µg pOG44 und 0,4 µg des zu integrierenden Plasmids (hier pcDNA5::OCT2) hinzu und inkubiert den Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wird das Medium aus den Wells der Platte gesaugt, die Zellen mit Antibiotika-freiem Medium (DMEM + 10% FCS) einmalig gewaschen und anschließend 1,9 ml dieses Mediums pro Well hinzugegeben. Der Ansatz mit dem zu transfizierenden Plasmid wird in jedes Well pipettiert. Nach 1–2 Tagen wird das Medium aus den Wells gesaugt und die Zellen mit 1 ml Medium (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) gewaschen und in einer zuvor mit Poly-D-Lysin beschichteten 100-mm-Platte, in der 8 ml Medium vorgelegt werden, durch Suspensieren in 2 ml Medium überführt. Nach einem Tag werden 300 µg/ml Hygromycin hinzugegeben, die Zellen bei 37°C inkubiert und für die nächsten Tage beobachtet. Nach 1–2 Wochen sterben die Zellen ohne Hygromycin-Resistenz. Nur noch einzelne Zellkolonien bleiben übrig. Die einzelnen Kolonien werden jeweils in ein Well einer 12-Well-Platte mit Medium (DMEM + 10% FCS + 1% P/S + 200 µg/ml Hygromycin) pipettiert. Nach Erreichen von 90% Konfluenz wäscht man die Zellen und überführt sie in ein Well einer 6-Well-Platte. Nach dem Erreichen von 90% Konfluenz werden die Zellen in eine Zellkulturflasche (25 cm²) zum Kultivieren überführt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass es zwischen den einzelnen Klonen zu keiner Kontamination kommt.

2.2.6 OCT1- und OCT2-Aktivitätsmessungen

2.2.6.1 ASP⁺-Aufnahme

Zur Messung der Aktivität des organischen Kationentransports OCT2 wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium, (ASP⁺) genannt, verwendet. Er besitzt einen Pyridin-Ring, ist am Stickstoff methyliert und trägt daher eine positive Ladung. Als kleines organisches Kation ist ASP⁺ ein ideales Substrat für die organischen Kationentransporter. Zudem fluoresziert das Molekül erst nach Membranbindung, sodass die Fluoreszenz erst nach Transport in das Zellinnere gemessen werden kann. ASP⁺ hat im Zelllysepuffer RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) ein Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von 485 nm und ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 612 nm. Noch energiereicher ist es bei membrangebundenem ASP⁺; es beträgt dort 550 nm.

Für die ASP-Aktivitätsmessung wird eine ASP⁺-Stammlösung (50 mM) in Dimethylformamid vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt. Pro Well werden 8×10^5 Zellen 1–2 Tage zuvor auf einer mit Poly-D-Lysin-beschichteten 12-Well-Platte ausplattiert. Nach Erreichen von 100% Konfluenz kann der Versuch durchgeführt werden. Zur Vorbereitung wird HBSS auf 37°C aufgewärmt und mit NaH₂PO₄ bzw. Na₂HPO₄ auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht. Das alte Medium wird abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml vorgewärmten HBSS gewaschen. Nun gibt man 0,5 ml vorgewärmtes HBSS mit der gewünschten Konzentration an ASP⁺ hinzu (0; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200, 500 µM). Nach einer dreiminütigen Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml kaltem HBSS gestoppt. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen in 500 µl RIPA-Puffer im Well lysiert und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. 100 µl des Lysats werden für die spätere Proteinmessung entnommen. Die verbliebenen 400 µl werden verteilt auf zwei Messungen (jeweils 200 µl) auf eine 96-Wellplatte (Black, Nunce, Wiesbaden) überführt und in einem Tecan Ultra (TECAN, Crailsheim) bei einer Exzitations-Wellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 612 nm fluorimetrisch vermessen. Anschließend vermisst man die Proteine wie oben beschrieben. Die gemessene Fluoreszenz wird mittels einer Verdünnungsreihe in die jeweilige ASP-Menge umgerechnet und auf den Proteingehalt und die Inkubationszeit mit ASP⁺ normiert.

2.2.6.2 Direkte Arzneistoffaufnahme

Zur Messung der Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin und Venlafaxin wird wie in bisher beschriebenen Transportexperimenten vorgegangen (Tzvetkov, Saadatmand et al. 2011). Zunächst werden auf einer mit Poly-D-Lysin beschichteten 100-mm-Platte 3×10^6 Zellen ausplatziert. Nach 2-3 Tagen sollten die Zellen eine Konfluenz von 100% erreicht haben. Zur Vorbereitung wird HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) auf 37°C aufgewärmt und mit NaH_2PO_4 bzw. Na_2HPO_4 auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen einmal mit zuvor vorgewärmten HBSS gewaschen. Anschließend inkubiert man die Zellen mit 5 ml HBSS (pH 7,4) und der gewünschten Arzneistoffkonzentration (hier: 1; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 200 μM). Nach 1 min wird die Reaktion durch Zugabe von 20 ml eiskaltem HBSS (pH 7,4) gestoppt. Das HBSS wird abgesaugt und erneut 20 ml eiskaltes HBSS zugegeben. Dieses wird auch abgesaugt. Mit 2 ml eiskaltem HBSS und einem Zellscharber werden die Zellen geerntet und in ein 2-ml-Reagiergefäß überführt. Nach mehrmaligem Hoch- und Runterpipettieren werden 200 μl entnommen und in ein 1,5-ml-Reagiergefäß zur späteren Proteinmessung überführt. Beide Reagiergefäße werden sofort auf Eis gestellt.

Anschließend werden die Zellen bei 4°C und 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zum Pellet gibt man jeweils 1 ml Lyse-Puffer und 5 μl internen Standard (1 μM). Durch Vortexen und anschließendem Zentrifugieren bei 4°C für 13 000 rpm für 10 min werden die Zellen lysiert. Der Überstand wird vorsichtig ohne Berühren des Pellets in ein HPLC-Röhrchen pipettiert und bei Raumtemperatur evaporiert. Der gelbe Rückstand wird in 100 μl Laufpuffer gelöst und in ein HPLC-Fläschchen überführt, welches anschließend in einer HPLC-Anlage vermessen wird (s. 2.2.7.2).

Lysepuffer	Volumen
Acetonitril	80 ml
Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; 0,05 M)	20 ml

Laufpuffer	Volumen
Acetonitril	20 ml
Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; 0,05 M)	80 ml

Die Zellen, die für die Proteinaufnahme entnommen wurden, werden bei 4°C und 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet in 200 µl RIPA-Puffer lysiert. Das Lysat kann im Kühlschrank aufbewahrt werden und bei Bedarf wie oben beschrieben vermessen werden.

2.2.7 Hoch-Leistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

2.2.7.1 Prinzip

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography: HPLC) ist eine Form der Säulenchromatographie, bei der das Elutionsmittel mithilfe von Pumpen durch die Trennsäule gedrückt wird. Sie dient der qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen bzw. Substanzgemischen. Bei den Trennungen finden sowohl Adsorptions- als auch Verteilungsvorgänge statt. Die Stofftrennung erfolgt hauptsächlich aufgrund von Löslichkeitsunterschieden in der stationären Phase.

2.2.7.2 Quantifizierung von Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin

Die Quantifizierung von Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin erfolgte mittels HPLC an einer Umkehrphase (reversed phase, RP).

2.2.7.2.1 Das Messsystem

Zur Bestimmung der Konzentration von Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin wurde eine HPLC-Anlage von Merck Hitachi (Darmstadt) verwendet. Sie besteht aus einem Interface (D-7000, Merck Hitachi), einer Pumpe (L-7100, Merck Hitachi), einem automatischen Probeneinlasssystem (L-7200, Merck Hitachi), einem Fluoreszenzdetektor (L-7485, Merck Hitachi) und einem Entgaser (L-7614, Merck Hitachi).

2.2.7.2.2 Stationäre Phase

Die Trennung erfolgte an einer LiChrospher-100 RP-18e-Säule (5 µm, 4 × 150 mm, Merck) mit einer vorgeschalteten LiChrospher-100CN-Vorsäule (5 µm, Merck).

2.2.7.2.3 Elutionsmittel

Die wässrige Phase besteht aus einem Natriumacetatpuffer (pH 5,0; 0,05 M), wobei 4,1 g Natriumacetat in 1 Liter ddH₂O gelöst werden und mit Eisessig auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wird. Anschließend wird Acetonitril hinzugegeben, wobei das Verhältnis zwischen wässriger Phase und Acetonitril 95:5 (v/v) beträgt.

2.2.7.2.4 Parameter

Die Trennung von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin erfolgte pro Lauf für 30 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min und Raumtemperatur. Die Peaks wurden fluorimetrisch bei einer Exzitationswellenlänge von 227 und einer Emissionswellenlänge von 300 detektiert. Die Retentionszeit für O-Desmethylvenlafaxin beträgt 6 min, während das Signal für Venlafaxin bei 16 min erscheint. Zur Kontrolle der Anlage eignet sich der Druck, der in diesem System konstant bei 60 bar liegen sollte.

2.2.7.2.5 Interner Standard

Um während der Aufbereitung der Zellen verloren gegangene Mengen an aufgenommenen Arzneistoff zu kompensieren, wird ein interner Standard zu allen Proben gegeben, wobei man bei der Bestimmung von Venlafaxin O-Desmethylvenlafaxin und bei der Bestimmung von O-Desmethylvenlafaxin Venlafaxin als internen Standard verwendet.

2.2.7.2.6 Auswertung

Die Peaks wurden anhand der Software HSM-Multimanager ausgewertet. Mittels einer Verdünnungsreihe konnte die detektierte Menge Arzneistoff bestimmt werden, die anschließend auf den internen Standard und die bestimmte Proteinmenge normiert wird.

2.2.7.3 Bestimmung des linearen Messbereichs

Um zu garantieren, dass die bei den Transportversuchen aufgenommene Menge von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin im linearen Messbereich des HPLC-Systems liegt, werden zuvor quantitative Bestimmungen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin mit immer kleiner werdenden Arzneistoffkonzentrationen durchgeführt. Die Standardabweichung darf nicht größer als 20% des Mittelwerts der Messungen sein.

2.2.8 Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA)

Mithilfe von PAMPAs kann man Carrier-unabhängige Membrandurchlässigkeiten bestimmen. Dabei wird die Permeabilität von Substanzen von einem Donorwell zu einem Akzeptorwell durch eine künstliche Lipidmembran gemessen. Vorgegangen wird nach dem Protokoll von BD Biosciences, Heidelberg. Bevor die 96-Well Platten verwendet werden können, müssen sie für mindestens 30 min auf Raumtemperatur gebracht werden. In der Zwischenzeit können unterschiedliche Verdünnungen der Testsubstanz in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) hergestellt werden (1; 5; 10; 20; 50; 100; 500 µM). Danach werden 300 µL der jeweiligen Verdünnungen in die Donorwells und 200 µl PBS (pH 7,4) in die Akzeptorwells pipettiert. Die Akzeptorplatte wird auf die Donorplatte aufgelegt und das dadurch resultierende System für 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Platten getrennt und sowohl aus dem Donor- als auch aus dem Akzeptorwell jeweils 150 µl Lösung entnommen, um mittels HPLC die Endkonzentrationen zu bestimmen. Eine Aufbereitung der Proben ist nicht nötig, da PBS weder fluoresziert noch absorbiert und dadurch keine Störsignale auftreten können. Mit den gemessenen Werten und folgender Formel lässt sich die Membranpermeabilität berechnen:

$$P_e = -\ln [1 - C_A \times (V_D + V_A) / (C_D \times V_D + C_A \times V_A)] / [A \times (1/V_D + 1/V_A) \times t],$$

wobei C_A die Endkonzentration im Akzeptorwell,

C_D die Endkonzentration im Donorwell,

V_D das Volumen im Donorwell (300 µL),

V_A das Volumen im Akzeptorwell (200 µL),

A die Fläche der Wells (0,3 cm²) und

t die Inkubationszeit des Plattensystems in Sekunden (18 000 s) ist.

V_D , V_A , A und t bleiben in allen Versuchen konstant.

3. ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung einer Methode für den Nachweis von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

Zur Quantifizierung der in den Transportversuchen aufgenommenen Konzentrationen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin wurde eine HPLC-Methode an einer Umkehrphase mit fluorimetrischer Detektion verwendet. Die HPLC-Methode zur Messung von Desvenlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin wurde aus dem Protokoll für die Vermessung von Tramadol und O-Desmethyltramadol übernommen, da hier große Strukturähnlichkeiten bestehen und sich somit auch gleiche Lösungseigenschaften vermuten lassen (Tzvetkov, Saadatmand et al. 2011). Die Retentionszeiten für Venlafaxin und Desvenlafaxin betragen 15,6 und 7,5 min (Abbildung 9). Um sicher zu gehen, dass die Proben mit einer ausreichenden Genauigkeit, also im Bereich über der Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification) bestimmt werden konnten, wurden zehn Kalibrierkurven in Duplikaten vermessen, wobei unterschiedliche Konzentrationen zum Einsatz kamen (4; 8; 12; 16; 100; 200 ng/ml). Nach Bildung einer Regressionslinie ließ sich anhand der Mittelwerte zeigen, dass eine annähernd gute Regression mit einem R^2 von 0,9996 für Venlafaxin (Abbildung 10) und einem R^2 von 0,9995 für O-Desmethylvenlafaxin (Abbildung 11) möglich war. Ein Messwert gilt als quantitativ bestimmt, wenn sein Variationskoeffizient nicht 20% überschreitet (FDA 2001). Betrachtet man nun die Variationskoeffizienten der Messungen (Tabelle 20), so ist erkennbar, dass man für Venlafaxin bei allen Verdünnungen noch in einem tolerablen Messbereich liegt, da der höchste Variationskoeffizient bei 14% für die kleinste Konzentration (4 ng/ml) liegt. O-Desmethylvenlafaxin lässt sich nicht in ganz so niedrigen Konzentrationen bestimmen, da der Variationskoeffizient für 4 ng/ml mit 47% zu hoch liegt und bei 8 ng/ml mit ca. 22% nur grenzwertig ist. Da aber die Proben alle eine Konzentration von über 8 ng/ml besitzen, ist sicher, dass die gemessenen Werte der Proben im linearen Messbereich liegen.

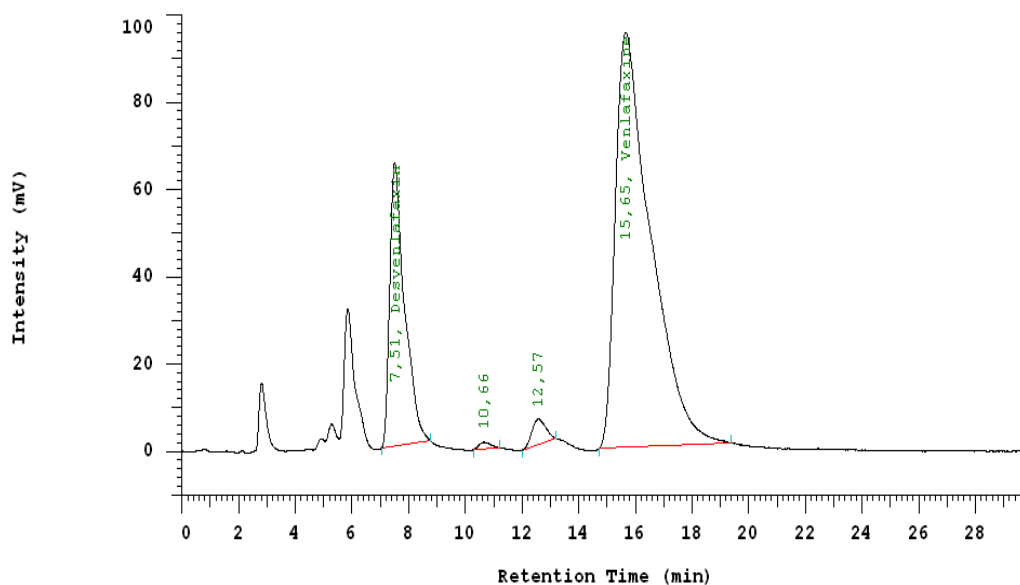


Abbildung 9: Chromatogramm von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

Gemessen wurden verschiedene Konzentrationen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin in einem HPLC-System unter Verwendung eines Fließmittels bestehend aus einer Natriumacetat-Lösung (pH 5) und Acetonitril (95:5 v/v) und fluorimetrisch detektiert bei einer Wellenlänge von 227 und 300 nm. Die Retentionszeit für Venlafaxin liegt bei 15,6 min, die für O-Desmethylvenlafaxin bei 7,5 min.

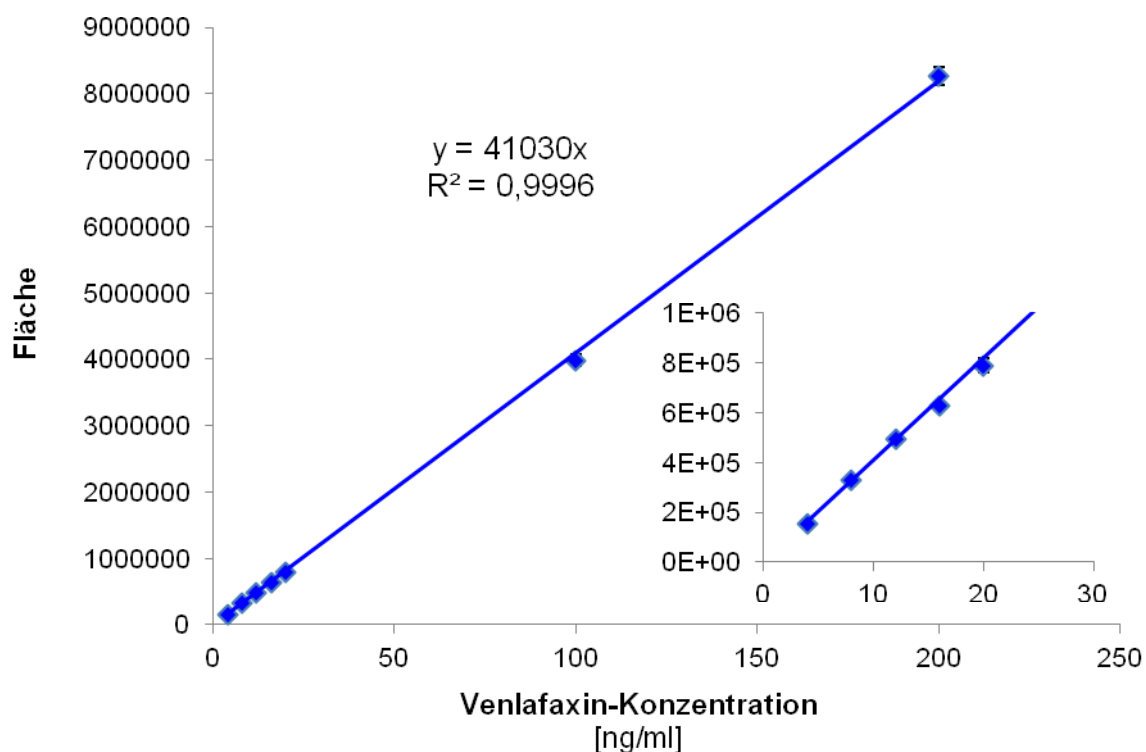


Abbildung 10: Kalibriergerade für Venlafaxin.

Gemessen wurden verschiedene Konzentrationen (4; 8; 12; 16; 100; 200 ng/ml) von Venlafaxin in einem HPLC-System unter Verwendung eines Fließmittels bestehend aus einer Natriumacetat-Lösung (pH 5) und Acetonitril (95:5 v/v). Die Detektion erfolgte fluorimetrisch bei einer Wellenlänge von 227 und 300 nm.

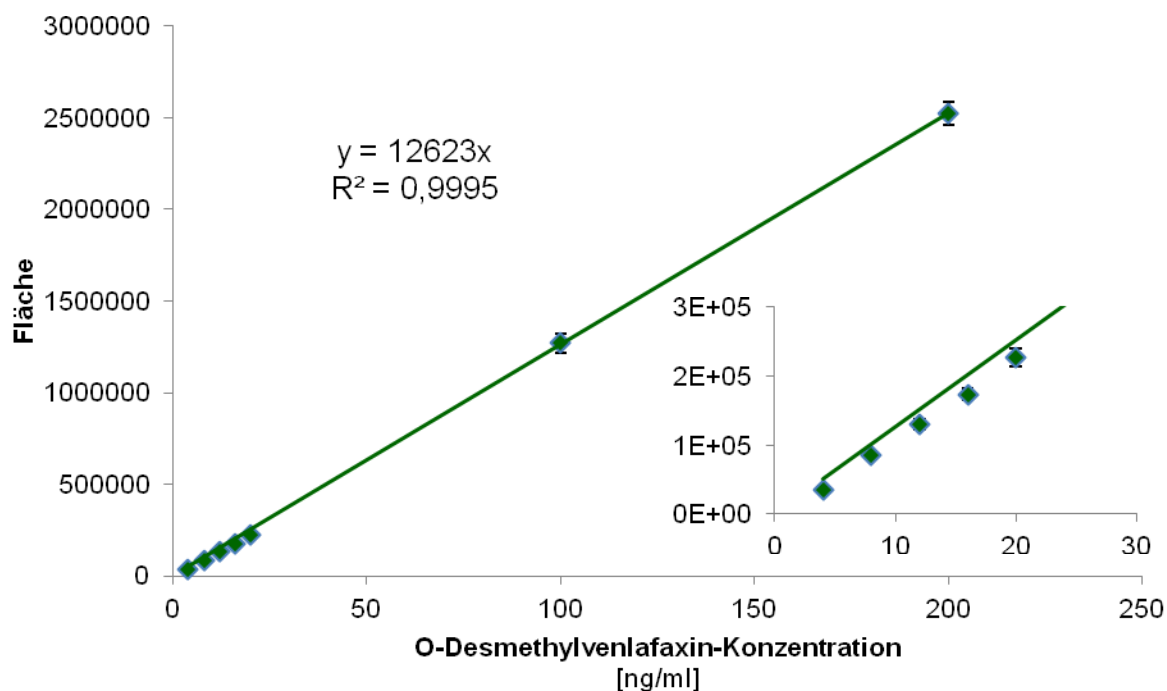


Abbildung 11: Kalibriergerade für O-Desmethylvenlafaxin

Gemessen wurden verschiedene Konzentrationen (4; 8; 12; 16; 100; 200 ng/ml) von O-Desmethylvenlafaxin in einem HPLC-System unter Verwendung eines Fließmittels bestehend aus einer Natriumacetat-Lösung (pH 5) und Acetonitril (95:5 v/v) und fluorimetrisch detektiert bei einer Wellenlänge von 227 und 300 nm.

Tabelle 20: Variationskoeffizienten der Mittelwerte für die Kalibriergeraden von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin gemessen im HPLC-System

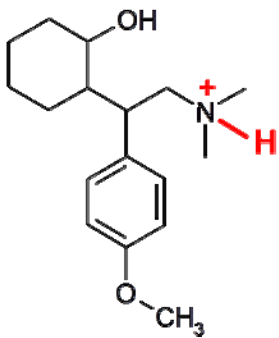
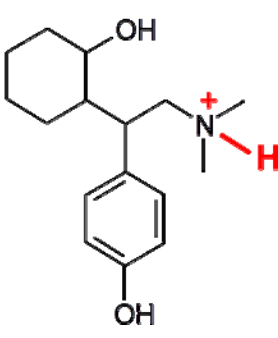
c in ng/ml	Variationskoeffizienten	
	Venlafaxin	O-Desmethylvenlafaxin
4	14%	47%
8	12%	22%
12	7%	18%
16	8%	16%
20	12%	18%
100	7%	13%
200	5%	8%

3.2 OCT1 als Aufnahmetransporter für Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

3.3 Carrier-unabhängige Membrandurchlässigkeit

Um die Carrier-unabhängige Membrandurchlässigkeit zu bestimmen, bediente man sich eines Parallel-Artificial-Membrane-Permeability-Assays (s. 2.2.8.). Während Venlafaxin eine hohe Membrandurchlässigkeit mit einem P_E von $6,2 \times 10^6$ cm/s aufweist, ist die Membranpermeabilität von O-Desmethylvenlafaxin mit einem P_E von $0,9 \times 10^6$ cm/s wesentlich geringer (Abbildung 12). Der Unterschied in den P_E -Werten lässt sich durch die Strukturunterschiede von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin erklären. Während O-Desmethylvenlafaxin eine freie Phenol-Gruppe besitzt, ist Venlafaxin an dieser Stelle methyliert und verliert dadurch an Polarität. Auch die Unterschiede in den $\log D_{7,4}$ -Werten bestätigen das (Tabelle 21). Die Ergebnisse des PAMPAs lassen vermuten, dass Venlafaxin durch Carrier-unabhängige Diffusion die Zellmembran passiert, während O-Desmethylvenlafaxin einen anderen Transportmechanismus benötigt.

Tabelle 21: Struktur und physiko-chemische Eigenschaften von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

	Venlafaxin	O-Desmethylvenlafaxin
Struktur		
logD _{7,4}	1,8	1,2
pK _s	5,2	5,2
Protonierter Anteil bei physiologischem pH-Wert (7,4)	99,4%	99,4%

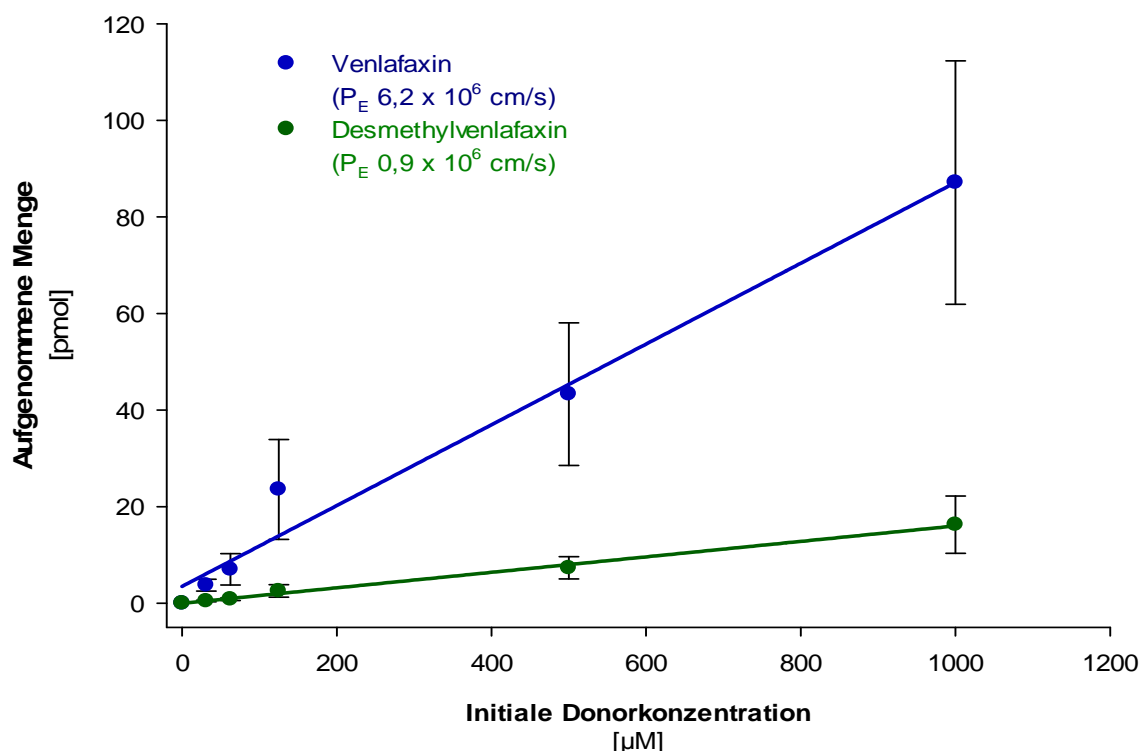


Abbildung 12: Carrier-unabhängige Membrandurchlässigkeit von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin mithilfe von Parallel-Artificial-Membrane Permeability-Assays (PAMPAs)
Bei dem P_E -Wert handelt es sich um den Mittelwert aus sechs unterschiedlichen Konzentrationen (1; 5; 10; 20; 50; 100; 500 μM). Die Graphen zeigen die Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Versuche, die in Duplikaten vermessen wurden.

3.4 Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme durch OCT1

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe, durchgeführt von Typhaine Ouethy (Abteilung Klinische Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen), konnte ein Einfluss von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin auf die Aufnahme vom OCT1-Modellsubstrat ASP^+ gezeigt werden. Venlafaxin besitzt demnach einen IC_{50} von 41,8 μM und O-Desmethylvenlafaxin einen IC_{50} von 18,5 μM . Diese Ergebnisse lassen eine Interaktion zwischen OCT1 und den Substanzen Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin vermuten. Deshalb sollte im nächsten Schritt der Transport von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin untersucht werden. Um die transporterunabhängige Aufnahme zu messen, also die Carrier-unabhängige Diffusion, wurden HEK293-Zellen mit einem leeren Plasmid (pcDNA5-Zellen) verwendet. Die Generierung und Charakterisierung der OCT1-überexprimierenden Zellen wurde zuvor beschrieben (Saadatmand 2012).

Die Transportversuche für Venlafaxin (1 μM) zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied (t-Test, $p=0.586$) zwischen den Kontrollzellen und den OCT1-Zellen im Aufnahmeverhalten für Venlafaxin gibt (Abbildung 13). Beide nehmen dieselbe Menge an Venlafaxin auf, was vermuten lässt, dass Venlafaxin kein Substrat des Organischen Kationentransportes OCT1 ist. Im Gegensatz dazu zeigt O-Desmethylvenlafaxin (1 μM) einen 2,3-fach höheren Aufnahmetransport durch OCT1 im Gegensatz zu den Kontrollzellen ($p < 0,001$; t-Test). Die Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin konnte in ausreichend hoher MPP⁺-Konzentration (350 μM), einem bekannten Inhibitor des OCT1, fast bis auf das Aufnahmelevel der Kontrollzellen gehemmt werden (Abbildung 14). Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass O-Desmethylvenlafaxin ein Substrat des OCT1 ist.

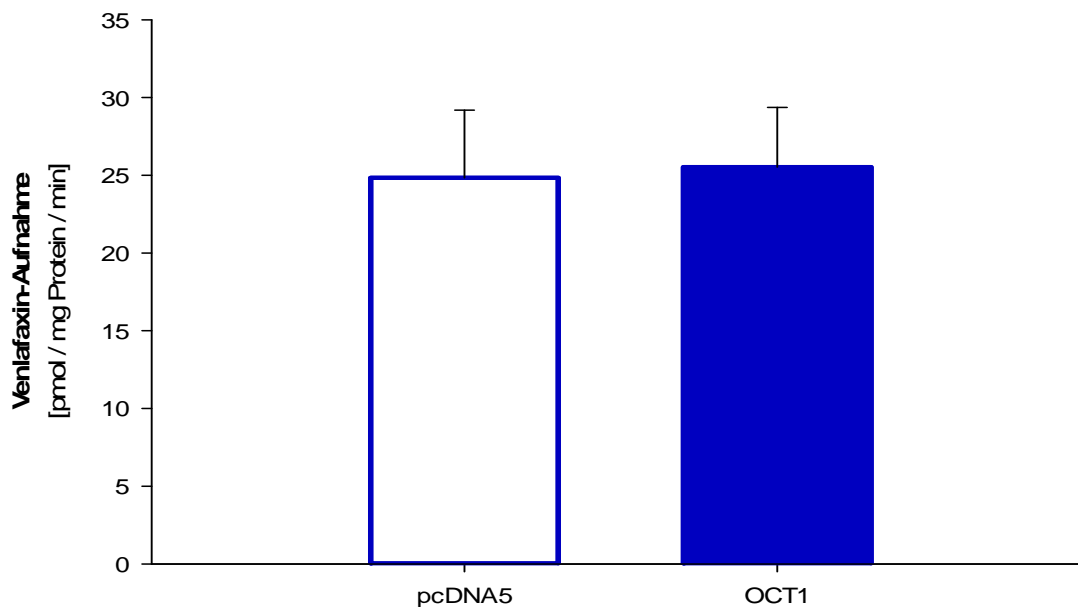


Abbildung 13: Messung der Venlafaxin-Aufnahme in OCT1 überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen. Kontrollzellen (pcDNA5, weiße Säule) und OCT1-WT-Zellen (blaue Säule) wurden für 1 min mit Venlafaxin (1 μM) bei Raumtemperatur inkubiert und nach Vermessung in der HPLC-Anlage auf die jeweiligen Proteinwerte normiert.

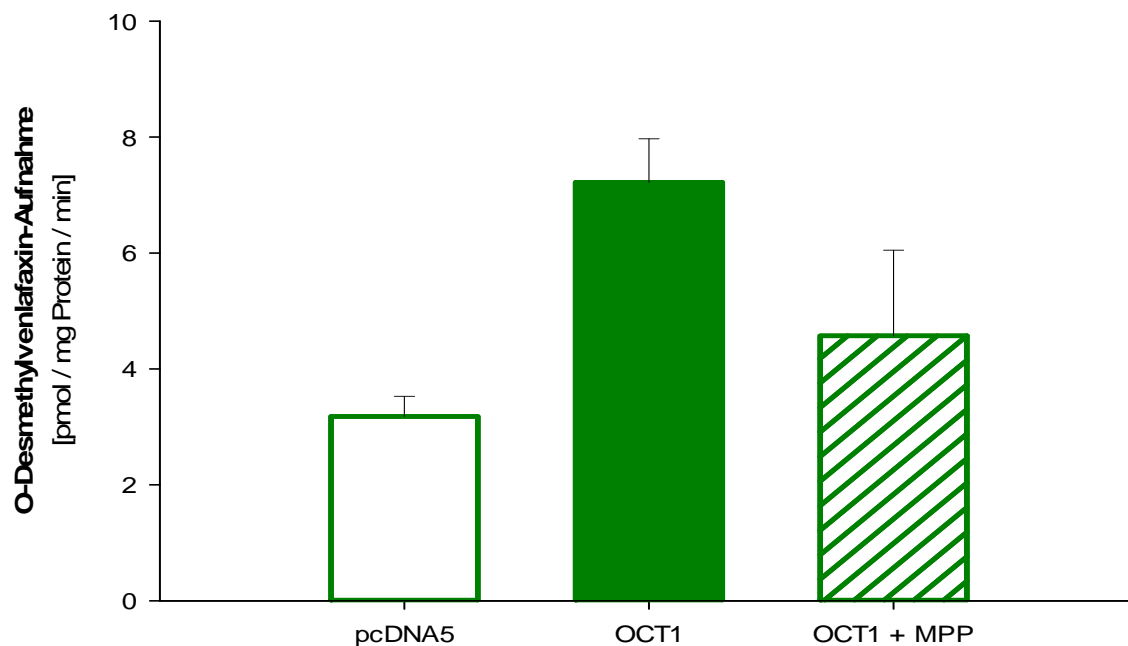


Abbildung 14: Messung der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme in OCT1 überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen

Kontrollzellen (pcDNA5, weiße Säule) und OCT1-WT-Zellen (grüne Säule) wurden für 1 min mit O-Desmethylvenlafaxin (1 μM) bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden OCT1-Wildtypzellen mit O-Desmethylvenlafaxin (1 μM) und dem Inhibitor MPP⁺ (350 μM) für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten eine Vermessung in der HPLC-Anlage und eine Proteinnormierung.

Im nächsten Schritt sollte die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin untersucht werden. Dazu führte man die gleichen Transportexperimente wie oben beschrieben durch, wobei die Konzentration (1; 5; 10; 20; 40; 80; 120; 200 μM) von O-Desmethylvenlafaxin variierte (Abbildung 15). Es ließ sich zeigen, dass es sich bei der Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin um einen sättigbaren Prozess handelt, der der Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Abbildung 16 und Abbildung 17). Ein K_m -Wert von 23,6 μM wurde bestimmt. Auch dies bestärkte die Vermutung, dass O-Desmethylvenlafaxin ein OCT1-Substrat ist.

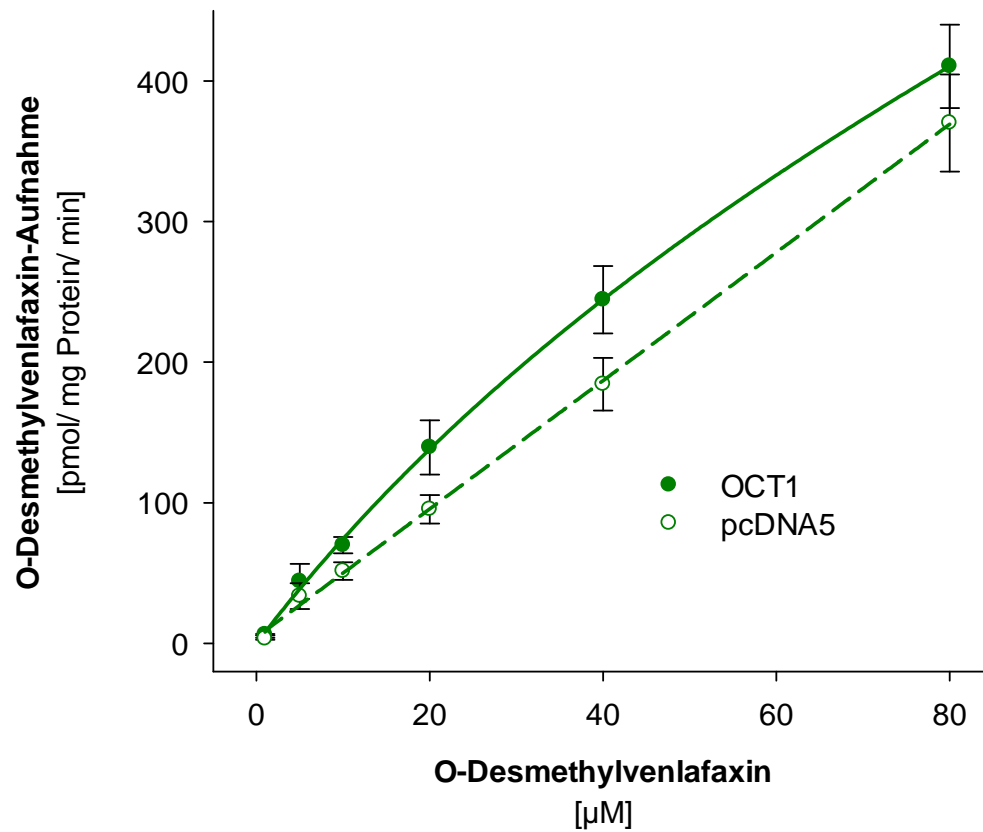


Abbildung 15: Konzentrationsabhängigkeit von O-Desmethylvenlafaxin
Kontrollzellen (pcDNA5-Zellen) und OCT1-überexprimierenden HEK T-Rex-Zellen wurden für 1 min mit unterschiedlichen Konzentration (1; 5; 10; 20; 40; 80 μ M) von O-Desmethylvenlafaxin inkubiert und nach Vermessung in der HPLC-Anlage auf die jeweiligen Proteinwerte normiert.

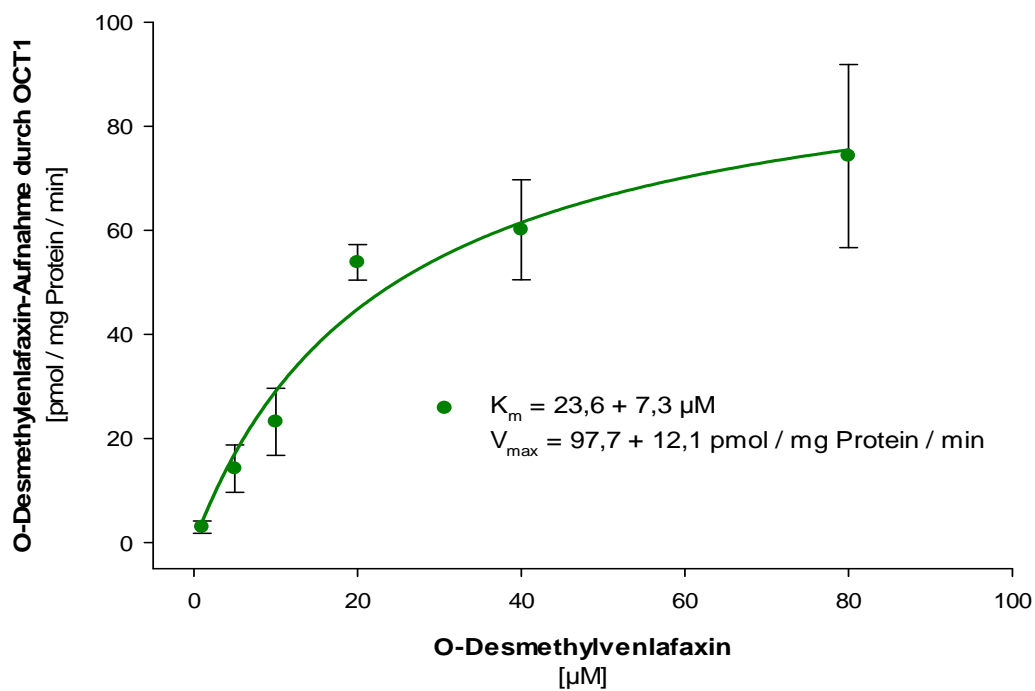


Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin mittels OCT1
 Die OCT1-spezifische O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme wurde durch Subtraktion der Aufnahme in den Kontrollzellen von den OCT1-überexprimierenden HEK T-Rex-Zellen aus Abbildung A ermittelt.

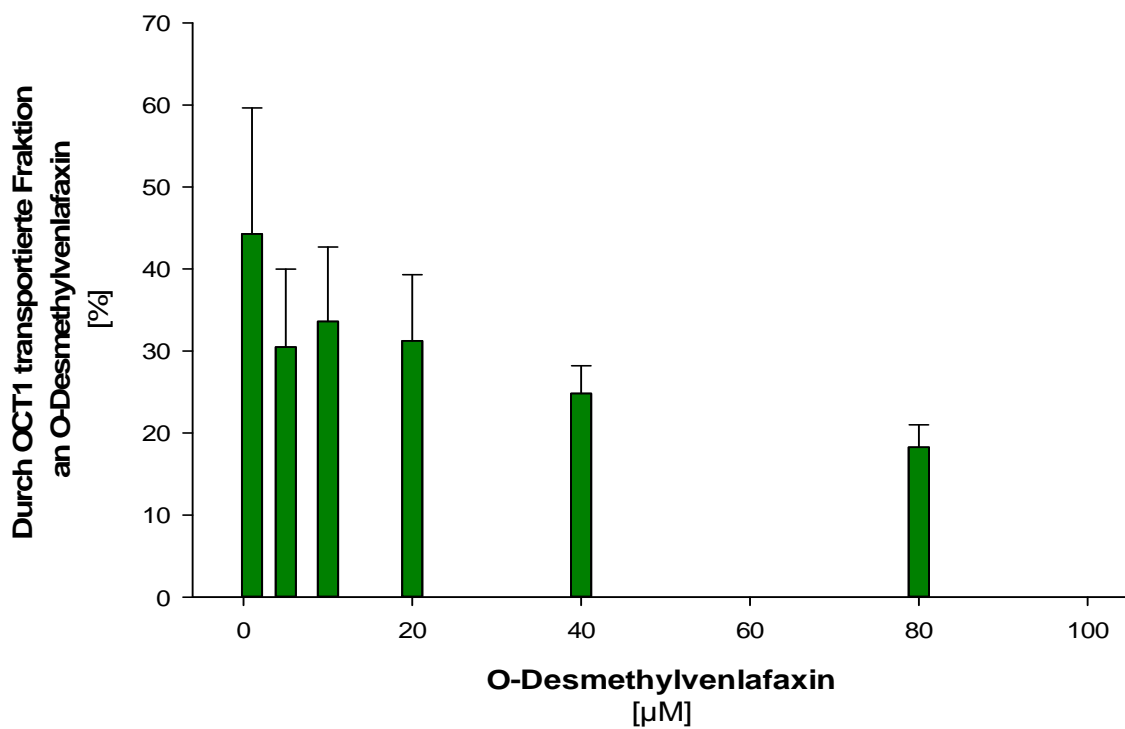


Abbildung 17: Durch OCT1 transportierte Fraktion an O-Desmethylvenlafaxin

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss bekannter OCT1-Genvarianten, die bekanntlich zu einem Funktionsverlust des OCT1-Transporters führen sollen, untersucht werden. Es wurden folgende Varianten analysiert: Arg61Cys, Gly401Ser, Met420del oder eine Kombination von Met420del und Cys88Arg oder Met420del und Gly465Arg. Die Generierung und Charakterisierung der verwendeten OCT1-überexprimierenden Zellen wurde zuvor beschrieben (Saadatmand 2012). Alle hier untersuchten Varianten haben keine Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin gezeigt (Abbildung 18). Lediglich die Aufnahme durch Carrier-unabhängige Diffusion konnte wie in den Kontrollzellen gezeigt werden. Während im Vergleich zu den Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied dargestellt werden konnte, gibt es einen signifikanten Unterschied in der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme zwischen den Wildtypzellen und den untersuchten genetischen Varianten (t-Test, $p < 0,05$).

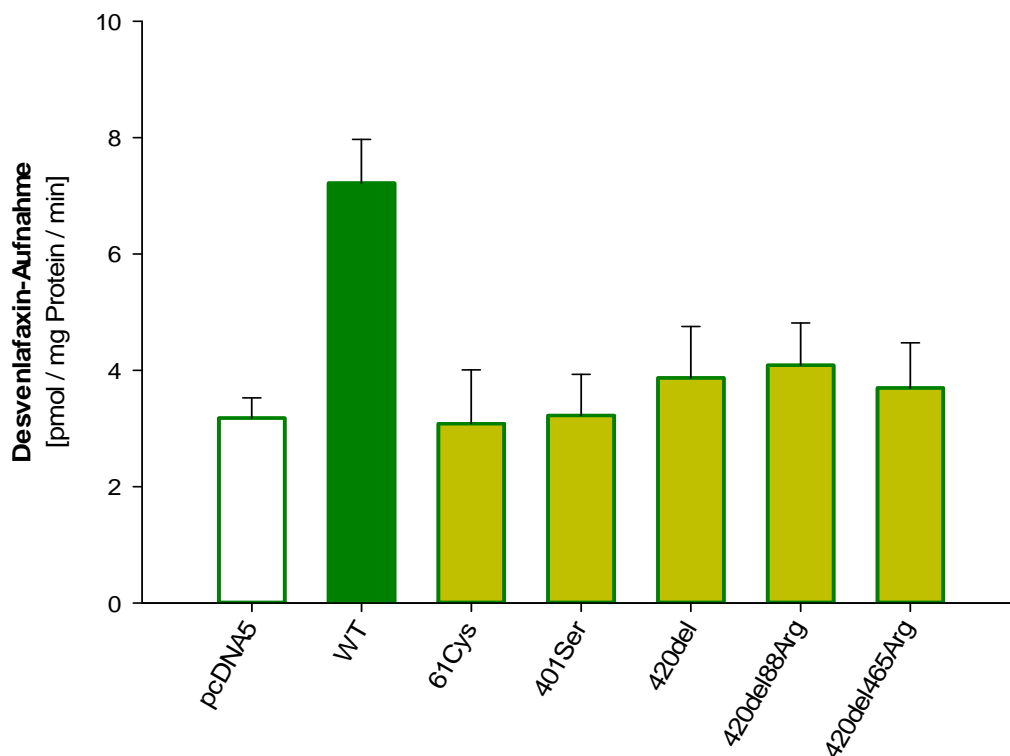


Abbildung 18: Messung der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme in OCT1 überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen und häufig auftretenden genetischen Varianten
Kontrollzellen (pcDNA 5, weiße Säule), OCT1-WT-Zellen (grüne Säule) und OCT1-Genvarianten (gelbe Säulen) wurden für 1 min mit O-Desmethylvenlafaxin (1 μ M) bei Raumtemperatur inkubiert und nach Vermessung in der HPLC-Anlage auf die jeweiligen Proteinwerte normiert.

Abschließend lässt sich sagen, dass Venlafaxin kein Substrat des OCT1 ist und durch Carrier-unabhängige Diffusion in die Zelle dringt, während O-Desmethylvenlafaxin ein OCT1-Substrat ist und vermutlich mithilfe des OCT1 in die Zelle gelangt. Die häufig in Kaukasiern auftretenden Loss-of-function-OCT1-Varianten zeigen keine O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme.

3.5 Generierter und Charakterisierung von OCT2

3.5.1 Generierung vom pcDNA5::OCT2-Konstrukt

Als Nächstes sollte das Aufnahmeverhalten von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin durch den OCT2-Transporter untersucht werden. Dazu wurden OCT2-überexprimierende Zellen generiert und charakterisiert. Um ein pcDNA5::OCT2-Plasmid zu generieren, verwendete man das freundlicherweise von Prof. Hermann Koepsell (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellte OCT2-Gen aus dem prcCMV::OCT2-Plasmid. Die genetische Variante (270Ala>Ser) wurde durch gezielte Mutation des Ausgangsplasmids erzeugt. Sowohl der Wildtyp des OCT2-Gens als auch eine bekannte Variante des OCT2-Gens wurde in den Vektor pcDNA5 rekloniert. Dazu wurden die OCT2-Varianten mittels der Restriktionsenzyme *BamH* I und *Not* I (Abbildung 19) herausgeschnitten. Das Ausgangskonstrukt konnte nach Kultivierung in *E. coli* isoliert und zur weiteren Verwendung in HEK T-REx-Zellen stabil transfiziert werden.

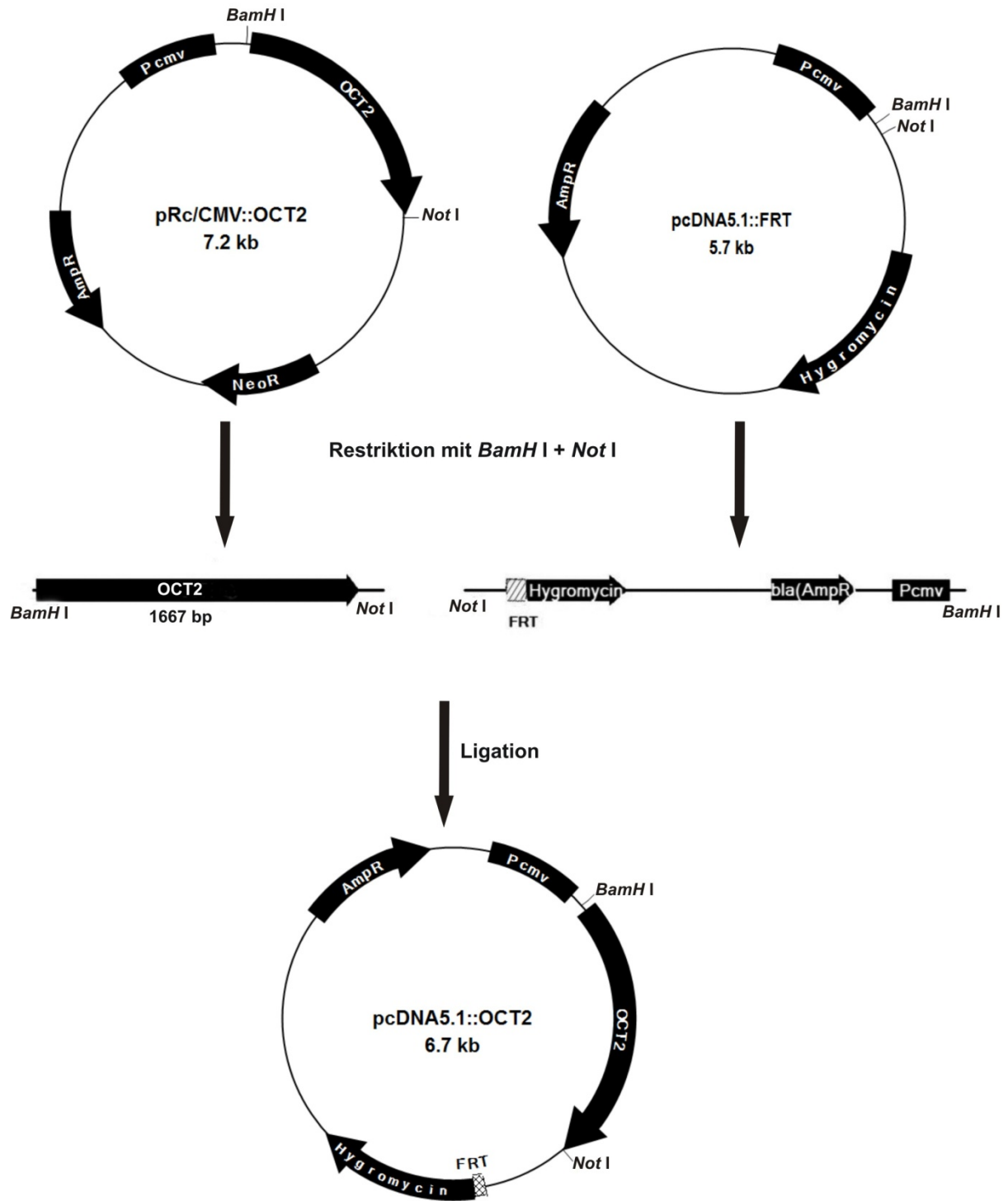


Abbildung 19: Darstellung der Klonierung von OCT2 in den Expressionsvektor pcDNA5
Das OCT2-enhaltende Fragment wurde aus prcCMV-Konstrukt mit *Bam*HI und *Not*I herausgeschnitten und anschließend in den Expressionsvektor pcDNA5 kloniert.

3.6 Generierung von OCT2-überexprimierenden Zellen

Zur Generierung von OCT2-überexprimierenden Zellen wurde das pcDNA5::OCT2-Konstrukt in HEK T-REx-Zellen mithilfe des Flp-In Systems (Invitrogen) stabil transfiziert. Die Selektion der Zellen erfolgte durch 300 µg/ml Hygromycin in DEMEM (+10% FCS, +1% Penicillin/Streptomycin). Während nach ca. zwei Wochen nur die Zellen mit gelungener Integration überlebten, verstarben alle anderen. Danach konnte die Hygromycin-Konzentration auf 100 µg/ml reduziert werden. Nach vier Wochen wurde Hygromycin-freies Medium verwendet.

3.6.1 Charakterisierung der OCT2-überexprimierenden Zellen

Insgesamt konnten sechs Hygromycin-resistente Klone selektiert und kultiviert werden, wobei es sich bei zwei Klonen um die Wildtyp-Variante Ala270 und bei vier Klonen um die Variante Ser270 handelt. Diese Klone wurden auf chromosomale Integration, m-RNA-Expression und Funktionalität überprüft. In allen Versuchen wurde als Negativkontrolle der leere Ausgangsvektor pcDNA5 verwendet.

3.6.2 Chromosomale Integration

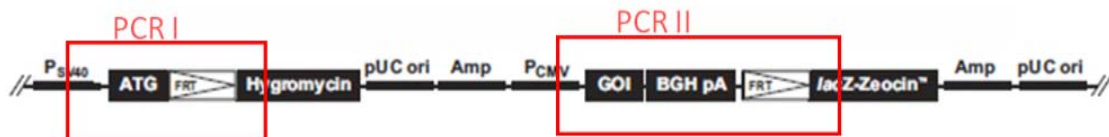
Um die chromosomale Integration des OCT2-Gens in den pcDNA5 Vektor zu untersuchen, bediente man sich zweier spezifischer PCR: PCR I und PCR II.

PCR I zeigt die Integration der Promoterregion für die Hygromycinresistenz mit einer Länge von 614 bp. Die auf dem Plasmid codierte Resistenz gegen Hygromycin sollte sich nach der Integration unmittelbar nach der SV40-Promotor-Region befinden (Abbildung 20 A). Das Start-Codon bildet nun den Beginn der Hygromycin-Resistenz. Die Primer wurden so gewählt, dass ein Produkt nur bei gelungener Konstruktion in den pcDNA5-Vektor entstand.

PCR II untersucht die Integration des OCT2-Gens, das nun unmittelbar vor der PCMV-Region liegt. Die Lac/Zeocin-Resistenz liegt durch die Integration erst nach dem OCT2-Gen. Es ergibt sich eine Basenpaarlänge von 2532 bp (Abbildung 20 A).

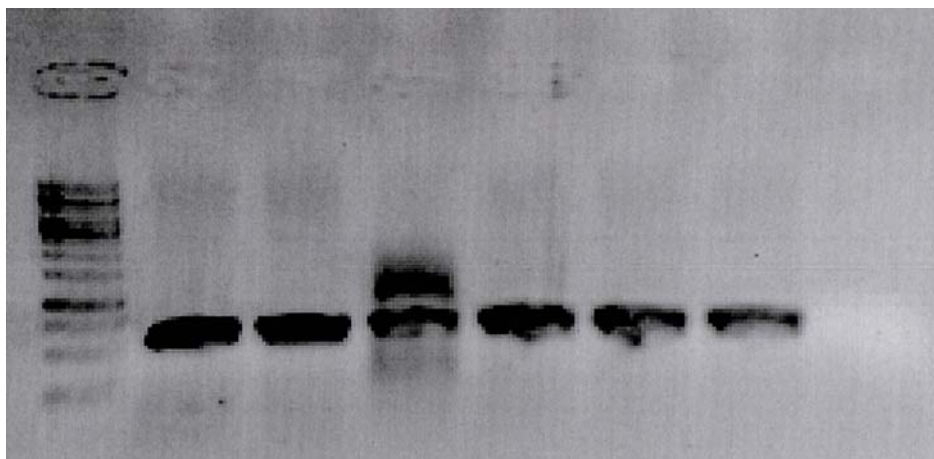
Beide PCRs konnten zeigen, dass bei den Ala270-Klonen 11 und 12 sowie den Ser270-Klonen 4, 12 und 13 die chromosomale Integration gelungen ist. Lediglich der Ser270-Klon 11 ist nicht positiv, da bei PCRI ein Schmiersignal und in PCRII kein Signal entstand (Abbildung 20 B und C).

(A)



(B) PCR I

Leiter	Ala270 Klon 11	Ala270 Klon 12	Ser270 Klon 11	Ser270 Klon 12	Ser270 Klon 13	Ser270 Klon 4	pcDNA5
--------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	---------------	--------



(C) PCR II

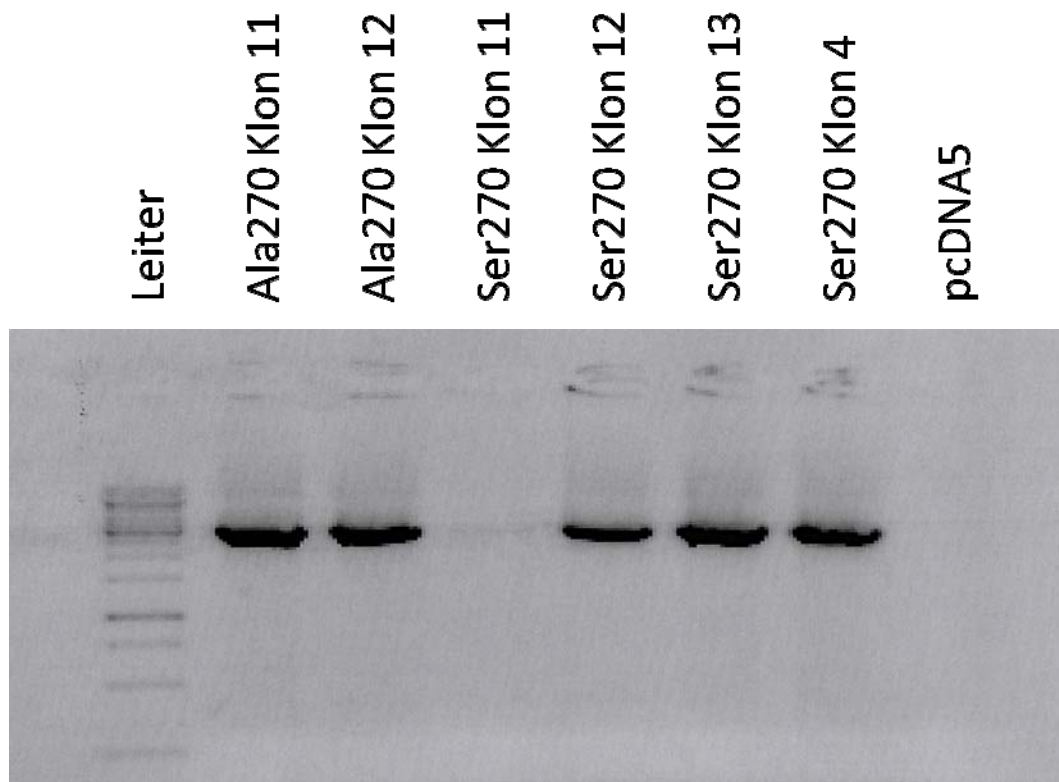


Abbildung 20: Integrationsspezifische PCRs zur Bestätigung der chromosomalen Integration
(A) Zwei Regionen aus dem Konstrukt wurden mittels zweier unterschiedlicher PCRs amplifiziert. (B) In PCRI wurde ein 614 bp langes Fragment amplifiziert, um die Resistenz gegenüber Hygromycin nachzuweisen. (C) In PCRII wurde ein 2532 bp langes Fragment amplifiziert, um die Integration des Gens zu überprüfen.

3.6.3 Sequenzierung

Die Produkte der PCRII wurden sequenziert. Es konnte dargelegt werden, dass alle Sequenzen mit der OCT2-Sequenz übereinstimmen. Der einzige Basenaustausch befand sich in den Ser270-Klonen Ser4, Ser12 und Ser13, da es sich bei diesen um eine genetische Variante des OCT2 270Ala>Ser handelt mit einem Basenaustausch von Guanin zu Thymin an der Basenpaarstelle 982.

3.6.4 RNA-Expression

Die OCT2-Überexpression der Zellen wurde durch eine quantitative Realtime-PCR untersucht. Alle identifizierten Klone zeigen eine Genexpression, die zwischen 5000 und 10000-fach höher ist als die der Kontrollzellen (Abbildung 21). Es konnte kein signifikanter Unter-

schied zwischen den Klonen nachgewiesen werden (ANOVA). Für den Ser270-Klon 4 ist eine fast 100000-fach höhere Expression gemessen worden. Da dies stark von den anderen Klonen abweicht, wurde dieser in weiteren Experimenten ausgeschlossen.

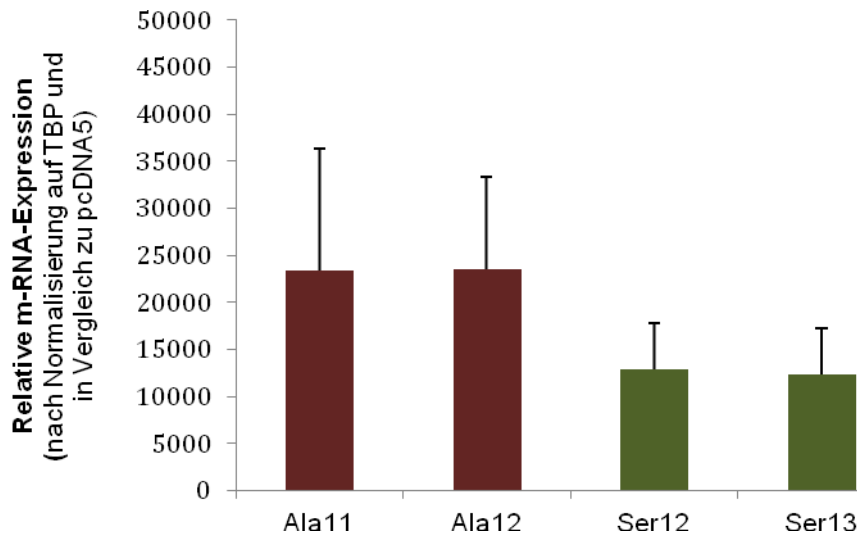
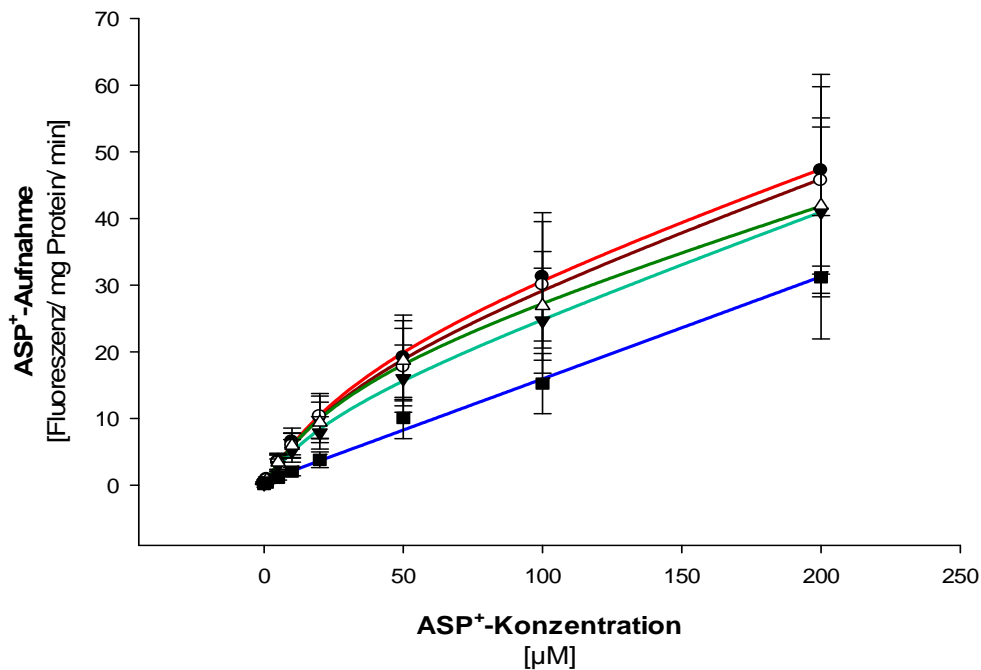


Abbildung 21: Expressionsrate von OCT2 in den stabil-transfizierten HEK T-Rex-Zellen
Das Säulendiagramm zeigt die relative m-RNA-Expressionsrate von OCT2 in den Ala270-Varianten (rot) und den Ser270-Varianten (grün), normalisiert auf den leeren Vektor pcDNA5 und dem Housekeeping-Gen TBP. Die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Messungen sind dargestellt.

3.6.5 Funktionsfähigkeit

Um die Funktionsfähigkeit der OCT2-überexprimierenden Zellen zu überprüfen, untersuchte man die Aufnahme des OCT2-Modells substrats ASP^+ in verschiedenen Konzentrationen bei gleicher Inkubationszeit von jeweils 3 min (Abbildung 22 A). Anhand eines sättigbaren Prozesses, der der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, konnte gezeigt werden, dass alle vier Klone OCT2-vermittelt ASP^+ aufnehmen (Abbildung 22 B). Alle vier Klone zeigen sowohl im K_m - als auch V_{max} -Wert keinen signifikanten Unterschied (ANOVA, Tabelle 22).

(A)



(B)

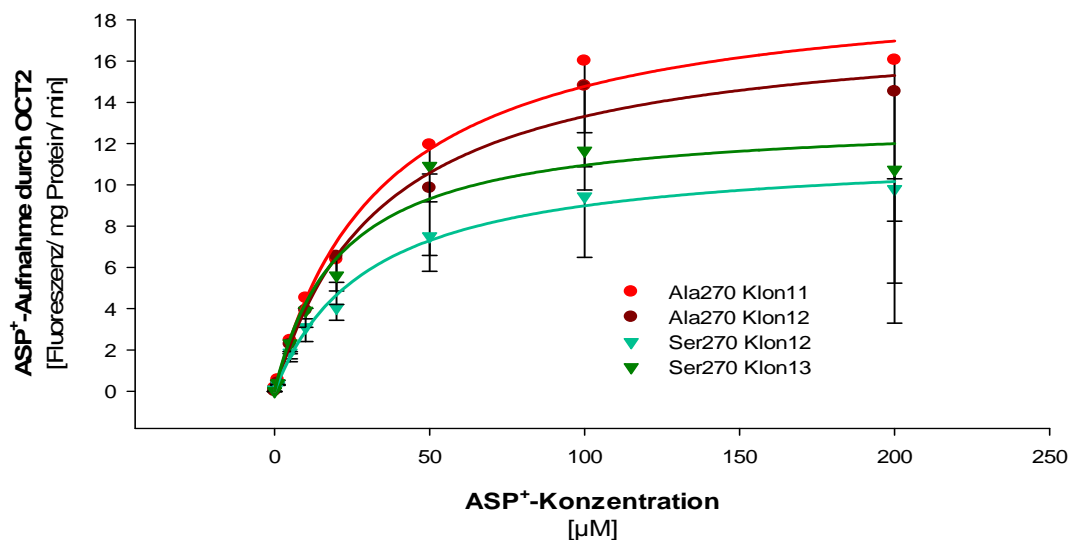


Abbildung 22: (A) Konzentrationsabhängigkeit von ASP⁺
Kontrollzellen (pcDNA5-Zellen) und OCT2-überexprimierenden HEK T-Rex-Zellen wurden für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen (1; 5; 10; 50; 100; 200 µM) von ASP⁺ inkubiert und nach fluorimetrischer Vermessung auf die Proteinwerte normiert.

(B) ASP⁺-Aufnahme durch OCT2

Die OCT2-spezifische ASP⁺-Aufnahme wurde durch Subtraktion der Aufnahme in den Kontrollzellen von den OCT2-überexprimierenden HEK T-Rex-Zellen aus Abbildung A ermittelt.

Tabelle 22: K_m - und V_{max} -Werte der OCT2-Klone

In der Tabelle sind die aus Abbildung 17B ermittelten K_m - und V_{max} -Werte und die dazugehörigen Standardfehler angegeben.

Klon	K_m (μM)	V_{max} (Fluoreszenz/mg Protein/ min)
Ala270 Klon11	$46,2 \pm 9,1$	$63,4 \pm 22,3$
Ala270 Klon12	$45,3 \pm 8,7$	$57,7 \pm 22,8$
Ser270 Klon12	$44,7 \pm 16,9$	$39,8 \pm 16,5$
Ser270 Klon13	$46,3 \pm 18,3$	$47,1 \pm 24,2$

3.7 OCT2 als Aufnahmetransporter von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

3.7.1 Venlafaxin-Aufnahme durch OCT2

Die Transportversuche für Venlafaxin zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den OCT2-Zellen im Aufnahmeverhalten für Venlafaxin gibt (Abbildung 23). OCT2-Zellen nehmen tendenziell mehr Venlafaxin als die Kontrollzellen auf. Jedoch muss hierzu erwähnt werden, dass der Wert für die Kontrollzellen aus den OCT1-Messungen stammt und erneute Messungen, bei denen sowohl die Kontroll- als auch die OCT2-Zellen verwendet werden, durchgeführt werden müssen. Auch sollte unbedingt ein Inhibitionsexperiment unter Inhibition der Venlafaxin-Aufnahme unter Einfluss von MPP^+ durchgeführt werden.

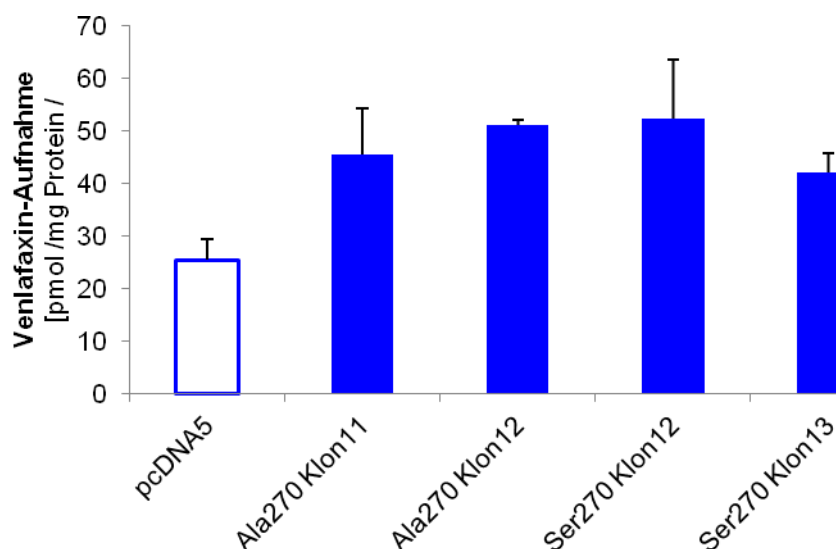


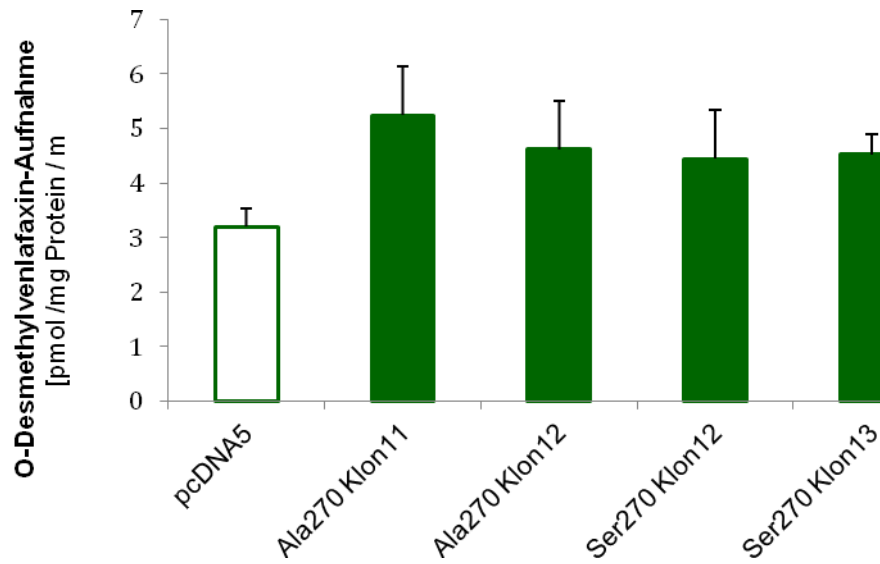
Abbildung 23: Messung der Venlafaxin-Aufnahme in OCT2-überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen. Kontrollzellen (pcDNA5, weiße Säule) und OCT2-Zellen (blaue Säule) wurden für 1 min mit Venlafaxin (1 μ M) bei Raumtemperatur inkubiert und nach Vermessung in der HPLC-Anlage auf die jeweiligen Proteinwerte normiert.

3.7.2 O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme durch OCT2 und SNP-Effekte

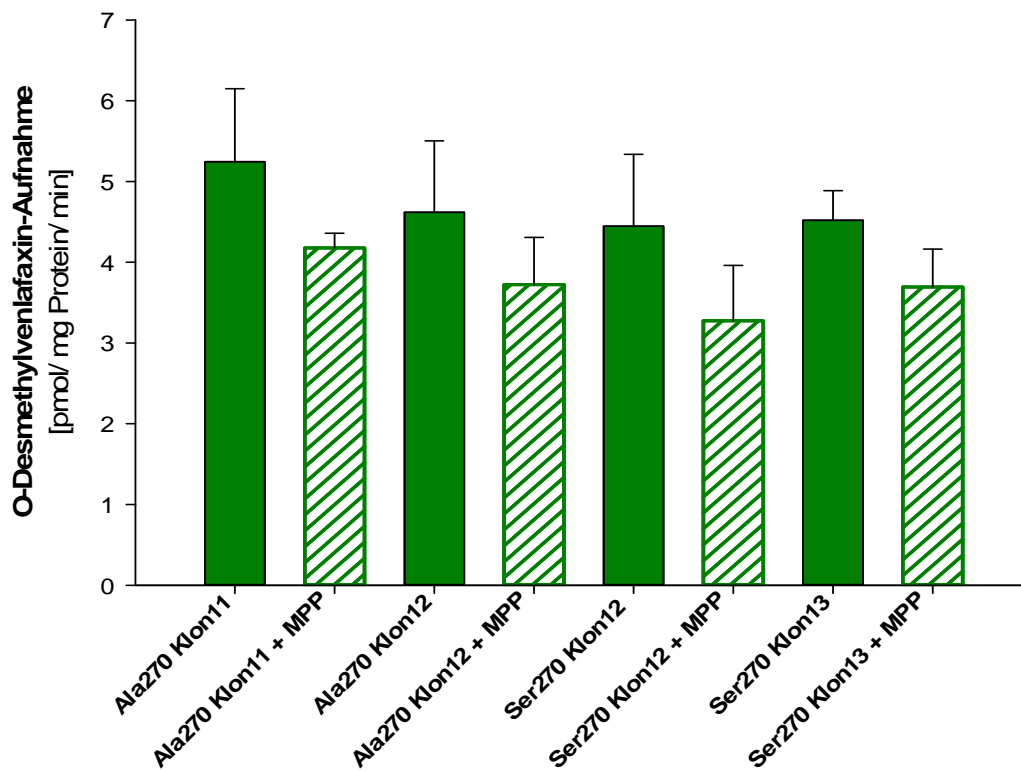
Die gleichen Versuche wurden für O-Desmethylvenlafaxin gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass die OCT2-Zellen 1,5-fach mehr O-Desmethylvenlafaxin aufnehmen als die Kontrollzellen, wobei es sich nicht um signifikante Unterschiede handelt (ANOVA, Abbildung 24 A). Auch hier muss erwähnt werden, dass die Werte für die Kontrollzellen aus den OCT1-Messungen stammen. Man könnte vermuten, dass O-Desmethylvenlafaxin zwar ein Substrat des OCT2-Transporters ist, aber keine ganz so starke Substratspezifität wie OCT1 besitzt. Um die Vermutung zu bestätigen, wurden Inhibitionsexperimente mit dem Modells substrat MPP⁺ (350 μ M) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass O-Desmethylvenlafaxin ein Substrat des OCT2-Transportes ist, da für alle Klone eine Inhibition der Aufnahme auf ca. 75% erfolgte, wobei es sich auch hier nicht um signifikante Ergebnisse handelt (t-Test, Abbildung 24 B, C). Betrachtet man im Vergleich dazu die Daten aus den OCT1-Messungen, wird die Vermutung, dass O-Desmethylvenlafaxin ein besseres Substrat des OCT1 als des OCT2 ist, bestätigt, da hier eine stärkere und signifikante Inhibition erfolgt, nämlich auf ca. 50% (Abbildung 14). Da es sich bei den OCT2-Daten nur um vorläufige Ergebnisse handelt, die zwar dreimal gemessen wurden, aber deren Werte noch sehr schwanken und die nur Tendenzen erkennen lassen, sollten diese Versuche mehrmalig wiederholt werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und konkrete Aussagen treffen zu können. Zudem sollten aufgrund

der Vermutung, dass O-Desmethylvenlafaxin ein nicht ganz so gutes Substrat für OCT2 wie für OCT1 ist, höhere O-Desmethylvenlafaxin- und MPP⁺-Konzentrationen in Betracht gezogen werden.

(A)



(B)



(C)

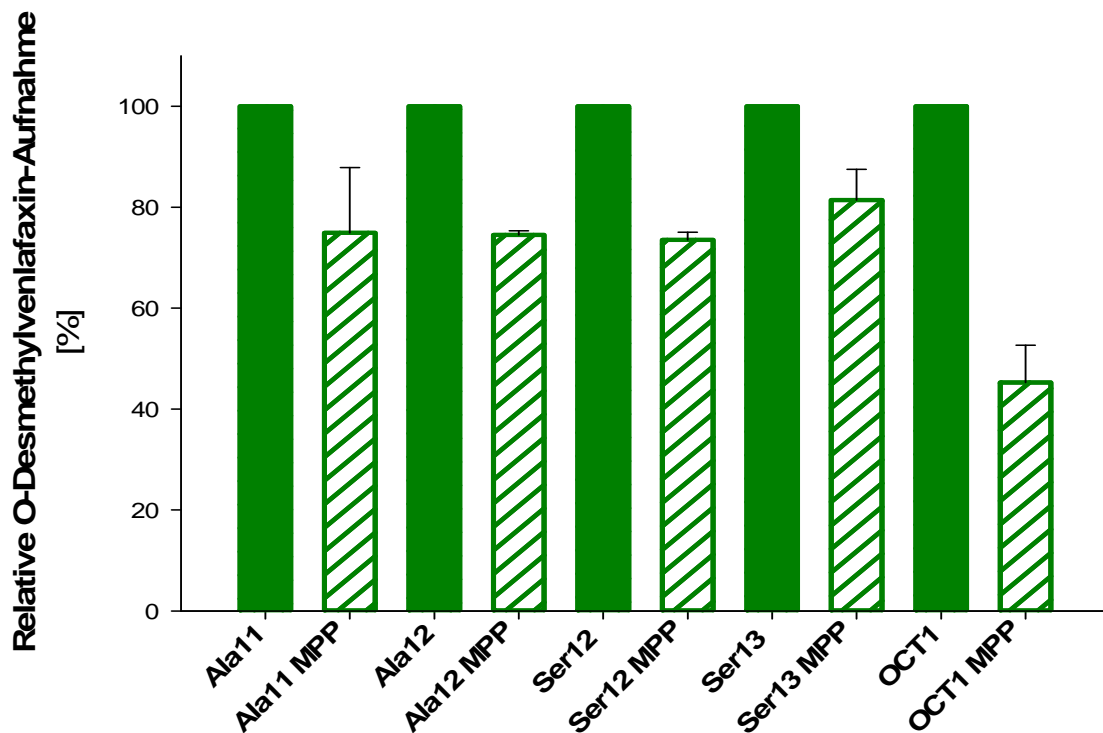


Abbildung 24: Messung der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme in OCT2-überexprimierenden HEK T-REx293-Zellen

(A) Kontrollzellen (pcDNA5, weiße Säule) und OCT2-Zellen (grüne Säulen) wurden für 1 min mit O-Desmethylvenlafaxin ($1 \mu\text{M}$) bei Raumtemperatur inkubiert und nach Vermessung in der HPLC-Anlage auf die jeweiligen Proteinwerte normiert. (B) O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme nach Inkubation mit O-Desmethylvenlafaxin (grüne Säulen) und zusätzliche Inhibition der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme (grün-weiß schraffierte Säulen) mit MPP^+ ($350 \mu\text{M}$). (C) Relative O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme nach Inkubation mit O-Desmethylvenlafaxin (grüne Säule) und zusätzliche Inhibition der O-Desmethylvenlafaxin-Aufnahme (grün-weiß schraffierte Säulen) mit MPP^+ ($350 \mu\text{M}$).

4. DISKUSSION

4.1 O-Desmethylvenlafaxin als OCT1-Substrat

Die Ergebnisse offenbaren, dass O-Desmethylvenlafaxin ein Substrat des OCT1-Transporters ist; Venlafaxin hingegen nicht. Die untersuchten genetischen Varianten des OCT1-Transporters zeigen keine Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin. O-Desmethylvenlafaxin und Venlafaxin scheinen beide Substrate des OCT2-Transporters zu sein, wobei O-Desmethylvenlafaxin ein schlechteres Substrat für OCT2 als für OCT1 ist.

Damit Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin ihre Wirkung im Zentralnervensystem entfalten können, müssen sie zunächst in den systemischen Kreislauf gelangen und die Leber passieren. Obwohl Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin einen pK_s -Wert von 5,2 haben und ähnliche Strukturen aufweisen, handelt es sich nur bei O-Desmethylvenlafaxin um ein Substrat des OCT1-Transporters. Venlafaxin besitzt mit einem $\log D_{7.4}$ -Wert von 1,8 im Vergleich zu O-Desmethylvenlafaxin mit einem $\log D_{7.4}$ -Wert von 1,2 eine vierfach höhere Oktanol-Wasser-Löslichkeit. Dieser Unterschied lässt sich durch die Methylierung an der Hydroxyl-Gruppe des Phenolrings begründen und erklärt die höhere Membran-Permeabilität von Venlafaxin mit einem P_E -Wert von $6,2 \times 10^6$ cm/s gegenüber O-Desmethylvenlafaxin mit einem P_E -Wert von $0,9 \times 10^6$ cm/s. Damit kann Venlafaxin mittels passiver Diffusion in die hepatische Zelle gelangen, während O-Desmethylvenlafaxin auf einen Transporter angewiesen ist. Die Ergebnisse lassen OCT1 als Transporter für die Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin in die hepatische Zelle vermuten. Sowohl die Versuche mit einer Konzentration als auch die Versuche mit ansteigender Konzentration, die der Michaelis-Menten-Kinetik folgen, bestätigen OCT1 als Aufnahmetransporter für O-Desmethylvenlafaxin.

Es konnte dargestellt werden, dass bekannte genetische Varianten einen Einfluss auf die Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin haben. In allen Fällen führten diese Varianten zu keiner Aufnahme des Arzneistoffs in die Zellen. Die Firma Wyeth, heute Tochterfirma von Pfizer, proklamierte, dass O-Desmethylvenlafaxin im Gegensatz zu Venlafaxin unabhängig von genetischen Polymorphismen ist, da es nicht in der Leber erst mittels dem bekanntermaßen polymorphen CYP2D6-Isoenzym metabolisiert werden müsste. Insgesamt 10% der kaukasischen Bevölkerung sind „Langsam-Metabolisierer“ (poor metabolizer) und besitzen somit

eine extrem verminderte Metabolisierungsgeschwindigkeit (Nichols, Focht et al. 2011). Die Versuche zeigen, dass entgegen der Aussage von Wyeth die Metabolisierung von O-Desmethylvenlafaxin dem Einfluss eines fast genauso häufig auftretenden Polymorphismus unterliegt, nämlich dem des OCT1. Etwa 9% der kaukasischen Bevölkerung haben keine Aktivität des OCT1. Während dies keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Venlafaxin haben sollte, da dieses über passive Diffusion in die Leberzelle gelangt, scheinen diese Polymorphismen einen Einfluss auf die Pharmakokinetik von O-Desmethylvenlafaxin zu haben. Dies würde bedeuten, dass Patienten, die O-Desmethylvenlafaxin erhalten und gleichzeitig einen der untersuchten Polymorphismen besitzen, eine verringerte Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin in der Leber haben. Der Arzneistoff wird somit nicht metabolisiert, könnte sich anreichern und das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen erhöhen. Somit stellt sich die Frage, ob O-Desmethylvenlafaxin weniger sicher ist als Venlafaxin. Gerade deshalb lässt sich sagen, dass die EMEA beim Nichterteilen der Zulassung für O-Desmethylvenlafaxin, wenn auch mit einer anderen Begründung, im Gegensatz zur FDA vorläufig richtig gehandelt hat. Jedoch lassen bisher nur *In-vitro*-Versuche eine solche Vermutung zu, die unbedingt durch *In-vivo*-Versuche bestätigt werden muss.

In dieser Arbeit wurde dargelegt, dass OCT1 in der Lage ist, O-Desmethylvenlafaxin in die Zellen zu transportieren (Abbildung 14). Es kann vermutet werden, dass bei gleichzeitiger Einnahme mit anderen Arzneistoffen die Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin durch den OCT1-Transporter inhibiert wird. Dies könnte zur Folge haben, dass sich der Arzneistoff im Körper des Patienten anreichert und es zu toxischen Plasmaspiegeln und unerwünschten Nebenwirkungen kommt. Gerade bei den selektiven Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern können diese beträchtlich sein. Es ist mit Übelkeit, Schwindel, Schlaflosigkeit, Hyperhidrose, Obstipation, Appetitlosigkeit, Angstzuständen und sexueller Dysfunktion zu rechnen. Diese Nebenwirkungen traten in Placebo-kontrollierten Kurzzeit-Studien zur Einnahme von O-Desmethylvenlafaxin mit einer Inzidenz von $\geq 5\%$ auf (Pfizer 2013). Zudem könnte O-Desmethylvenlafaxin auch als Inhibitor des OCT1 wirken. In früheren *In-vitro*-Versuchen der Arbeitsgruppe, durchgeführt durch Typhaine Ouethy (Abteilung Klinische Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen), konnte ein Einfluss von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin auf die Aufnahme vom OCT1-Modells substrat ASP^+ gezeigt werden. Venlafaxin besitzt demnach einen IC_{50} von $41,8 \mu M$ und O-Desmethylvenlafaxin einen IC_{50} von $18,5 \mu M$. Da es sich sowohl bei Venlafaxin als auch bei O-Desmethylvenlafaxin um Inhibitoren des OCT1 handelt, sind hier Interaktionen mit

anderen Arzneistoffen zu befürchten. Ein Großteil der Arzneistoffe wird über die Leber in Phase-I und -Phase-II-Reaktionen metabolisiert, um entweder aktiviert oder eliminiert zu werden. Da inzwischen einige Arzneistoffe bekannt sind, die sicher auf den OCT1-Transporter angewiesen sind, um in die hepatische Zelle zu gelangen, ist zu befürchten, dass durch eine gleichzeitige Einnahme von Venlafaxin bzw. O-Desmethylvenlafaxin die Aufnahme des jeweiligen Arzneistoffs inhibiert wird. Solche Arzneistoffe können nicht mehr richtig eliminiert werden und reichern sich deshalb im Körper an. Beide Fälle sind für den Patienten kritisch, da zum einen keine ausreichende Therapie gewährleistet ist und zum anderen der Patient mit einem vermehrten Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen rechnen muss. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass Arzneistoff-Interaktionen erst dann klinisch relevant werden, wenn der c_{\max} -Wert der Arzneistoffe mehr als 1/10 des IC_{50} des jeweiligen Transporters beträgt. Sowohl für Venlafaxin als auch für O-Desmethylvenlafaxin ist der c_{\max} -Wert wesentlich geringer als der IC_{50} (Giacomini, Huang et al. 2010; Ahlin, Chen et al. 2011). Dennoch sind Arzneistoff-Interaktionen nicht sicher auszuschließen.

Es ist vorstellbar, dass die OCTs nicht nur als Influx- sondern auch als Effluxtransporter funktionieren. Bei einem physiologischen Membranpotenzial von -60 mV scheint eine Kationenaufnahme bevorzugt zu sein. Wenn die intrazelluläre Konzentration zehnfach höher ist als die extrazelluläre Konzentration, ist ein Auswärtstransport begünstigt (Koepsell, Lips et al. 2007). Sollte sich zeigen, dass O-Desmethylvenlafaxin durch OCT1 die Leber verlässt, so ist denkbar, dass Venlafaxin durch passive Diffusion in die Leberzelle gelangt, mittels CYP2D6 zu O-Desmethylvenlafaxin verstoffwechselt und nicht gleich eliminiert wird, sondern ein Teil davon mittels OCT1 wieder aus der Leberzelle gelangt und somit für eine anhaltende antidepressive Wirkung verantwortlich ist. Ein Auswärtstransport könnte durch zeitabhängige Messung für die mit OCT1-transfizierten Zellen untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Venlafaxin gelangt mittels passiver Diffusion in die hepatische Zelle.
- O-Desmethylvenlafaxin ist auf einen Transporter angewiesen, um in die hepatische Zelle zu gelangen, bei dem es sich vermutlich um den OCT1-Transporter handelt.
- Aminosäureaustausche führen zu einem Funktionsverlust des OCT1 und somit zu einer verringerten Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin.
- Arzneistoffe können durch Inhibition des OCT1 die Aufnahme von O-Desmethylvenlafaxin verhindern.

- Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin können als Inhibitoren des OCT1 die Aufnahme anderer Arzneistoffe, die auf den OCT1-Transporter angewiesen sind, verhindern.
- Ein möglicher Auswärtstransport von O-Desmethylvenlafaxin mittels OCT1 ist denkbar.

4.2 O-Desmethylvenlafaxin als OCT2-Substrat

Die Ergebnisse der Versuche mit den OCT2-Zellen lassen keine eindeutige Interpretation zu und mehrere Fragen offen:

- Sind wirklich O-Desmethylvenlafaxin und Venlafaxin Substrate des OCT2-Transporters?
- Wie sehen Substrate des OCT2-Transporters aus, wenn auch lipophilere Arzneistoffe wie das Venlafaxin aufgenommen werden?
- Ist Tramadol auch ein Substrat des OCT2-Transporters?
- Ist ein Auswärtstransport denkbar?

Ein Teil der Fragen lässt sich durch einfache Versuche beantworten. So sollten unbedingt die Transportversuche mit einer Konzentration (1 μM) von Venlafaxin beziehungsweise O-Desmethylvenlafaxin durchgeführt werden. Eventuell ist auch eine höhere Konzentration (z. B. 5 μM) nötig, um reproduzierbare Ergebnisse sehen zu können. Außerdem scheint gerade hier eine zeitabhängige Messung sinnvoll zu sein, da diese eine Antwort auf einen möglichen Auswärtstransport gibt.

Sollte sich bei Wiederholung der Versuche zeigen, dass Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin tatsächlich Substrate des OCT2-Transporters sind, so könnte man vermuten, dass beide Arzneistoffe OCT2 benötigen, um in das Gehirn zu gelangen und dort ihre Wirkung zu entfalten. Der genetische Polymorphismus scheint keinen Einfluss auf die Aufnahme zu besitzen; Arzneistoffinteraktionen mit OCT2-Inhibitoren wie Chinidin, Cimetidin und Testosteron hingegen sollten in Betracht gezogen werden.

4.3 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Sollten die Ergebnisse der In-vitro-Versuche in klinischen Studien bestätigt werden, so ist die Aussage, dass die Metabolisierung von O-Desmethylvenlafaxin im Gegensatz zu Venlafaxin nicht durch Arzneimittelinteraktion und genetische Polymorphismen beeinflusst wird, hinfällig.

Bei den in den Transport-Versuchen durchgeführten Konzentrationen handelt es sich um klinisch-relevante Konzentrationen, die bei der Gabe von Venlafaxin beziehungsweise O-Desmethylvenlafaxin im Körper erreicht werden. Beispielhaft wäre hier die Kenngröße c_{\max} , das für Venlafaxin $0,478 \mu\text{M}$ und für O-Desmethylvenlafaxin $0,650 \mu\text{M}$ beträgt. In den Versuchen wurden hauptsächlich Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ verwendet, die nicht weit entfernt von c_{\max} liegen.

Bisher wurden nur sehr wenige klinische Studien, die die Wirksamkeit und Sicherheit von O-Desmethylvenlafaxin untersuchen, durchgeführt. Keine dieser Studien lieferte in Bezug auf die antidepressive Wirkung von O-Desmethylvenlafaxin indirekt verglichen zu Venlafaxin überzeugende Ergebnisse. In einer Meta-Analyse kam heraus, dass die Behandlung von Venlafaxin im Vergleich zu Placebo den gleichen Effekt hat wie die Behandlung von O-Desmethylvenlafaxin im Vergleich zu Placebo, wobei O-Desmethylvenlafaxin eine Tendenz bezüglich besserer Verträglichkeit zu haben scheint (Coleman, Xavier et al. 2012). Das Problem bei den bisher durchgeführten Studien liegt darin, dass es sich ausschließlich um Placebo-kontrollierte Studien handelt; das heißt, dass O-Desmethylvenlafaxin nie direkt gegen Venlafaxin getestet wurde (Coleman, Xavier et al. 2012). Außerdem untersuchte keine der bisherigen Studien den Einfluss der OCT-Transporter. Die Ergebnisse sind demzufolge nicht nach OCT1-Varianten unterteilt. Es ist aber bekannt, dass der OCT1-Funktionsverlust in einem Zehntel der Kaukasier auftreten kann. Deswegen kann man annehmen, dass diese 10% auch in dem Probandenkollektiv zu finden sind. In einzelnen Studien ist zwar zu erkennen, dass trotz einer verminderten Dosis häufiger Nebenwirkungen bei der Einnahme von O-Desmethylvenlafaxin auftreten, jedoch ist hier eine Korrelation zu den Gründen nahezu unmöglich, während es bezüglich der Wirkung von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin keine Unterschiede zu geben scheint (Coleman, Xavier et al. 2012).

Da die Auswertung von Antidepressiva-Studien sich als schwierig gestaltet und es sich bei dem Großteil der Messinstrumente um eher subjektive Surrogatparameter handelt, die sich in

ihrer Bewertung von Patient zu Patient gewaltig unterscheiden können, ist ein klar definiertes Outcome-Kriterium nötig. So ist die Messung des Plasmaspiegels unabdingbar. Aber auch die Messung eines harten Surrogatparameters wie die Veränderung des Pupillendurchmessers aufgrund des serotonergen Effekts von O-Desmethylvenlafaxin bzw. Venlafaxin ist vorstellbar. Es lässt sich sagen, dass unbedingt eine klinische Studie mit einem klar definierten Studienendpunkt, gemessen anhand objektiver Messinstrumente, und einem genau beschriebenen Probandenkollektiv, bestehend aus homozygoten Trägern des Wildtyp-OCT1-Allels und der genetischen Variante, durchgeführt werden sollte, um eine Aussage über die klinische Relevanz von O-Desmethylvenlafaxin als Substrat des OCT1 zu treffen. Eine solche Studie ist in unserer Arbeitsgruppe vorgesehen.

4.4 Probleme bei der Versuchsdurchführung

Die nicht eindeutigen Ergebnisse der OCT2-Zellen lassen sich durch die unveränderbaren Versuchsbedingungen erklären: So schließt sich an die Durchführung der Transportversuche eine Reihe von Aufbereitungsschritten zur Vermessung an der HPLC-Anlage an. Zwar wird dabei hauptsächlich bei +4°C gearbeitet, was bekanntlich die effektivste Methode ist, um Transporter inaktiv zu halten, aber auch hier ist keine sichere Unterbrechung des Transportes gewährleistet. Deshalb ist zu vermuten, dass während der Aufbereitung ein Teil des Arzneistoffs entweder durch den Transporter oder durch passive Diffusion die Zellen wieder verlassen hat. Des Weiteren gestaltet sich das Ausplattieren der Zellen als schwierig. Zwar wurde laut Protokoll immer wieder die gleiche Zahl an Zellen ausplattiert, jedoch wuchsen die Zellen der einzelnen Zelllinien unterschiedlich schnell. So konnte es passieren, dass am Tag des Versuches einige Platten dichter bewachsen waren als andere. Auch wenn anschließend auf die Proteinmenge normiert wurde, konnte sich ein unterschiedlich schnelles Wachstum auf den Transport auswirken. So kommen bei übereinander wachsenden Zellen nicht alle Zellen in Berührung mit dem Arzneistoff, trotzdem werden diese Zellen bei der Normierung auf die Proteinmenge mit einbezogen. Auch die Messung der Proteinmenge stellte ein Problem dar. Die Werte konnten teilweise stark schwanken. Eine Zellzahlbestimmung könnte zu konsistenteren Ergebnissen führen.

4.5 Potenzielle Substrate für die OCTs

Es ist bekannt, dass die Wirkung von Venlafaxin bzw. O-Desmethylvenlafaxin aufgrund serotonerger Effekte erfolgt. O-Desmethylvenlafaxin inhibiert die Serotoninaufnahme in zehnfach stärkerer Auswirkung als die Noradrenalin-Aufnahme. Betrachtet man andere bekannte Substrate des OCT1 wie O-Desmethyltramadol, Ondansetron oder das Serotonin selbst (Koepsell, Lips et al. 2007; Tzvetkov, Saadatmand et al. 2011; Tzvetkov, Saadatmand et al. 2012), so lässt sich bei all diesen Substraten ein serotonerger Effekt nachweisen. Deshalb ist vorstellbar, dass allgemein Arzneistoffe mit einer serotonergen Wirkung häufig auch OCT-Substrate sind und gerade deshalb untersucht werden sollten. Dies lässt sich auch durch Vergleich der Struktur des Serotonins und serotonerg wirkender Arzneistoffe mit dem bekannten Pharmakophor erklären. So beträgt das Molekulargewicht <500 g/mol, das Molekül ist tendenziell, trotz des hydrophoben Teils, hydrophil, welcher sich immer in der Nähe der positiven Ladung befindet (Bednarczyk, Ekins et al. 2003; Koepsell, Lips et al. 2007; Ahlin, Karlsson et al. 2008; Nies, Hofmann et al. 2011). Mögliche OCT-Kandidaten wären z. B. die Triptane oder Antiemetika wie das Metoclopramid.

4.6 Fazit

Abschließend lässt sich sagen, dass man durch diese Versuche neben der stark anzuzweifeln Sicherheit von O-Desmethylvenlafaxin auch andere Erkenntnisse gewinnt. So lassen sich die OCTs mithilfe der Ergebnisse besser verstehen und erklären. Längerfristig werden sich bessere Aussagen über allgemeine chemische und stereochemische Merkmale von Inhibitoren und Substraten der OCTs treffen lassen und der Arzneistofftransport und Metabolismus verständlicher werden. Dadurch können sich für den Patienten nützliche Konsequenzen zur individuell-optimierten Antidepressiva-Therapie ergeben.

LITERATURVERZEICHNIS

Arzneiverordnungs-Report/2009.

- Ahlin, G., L. Chen, et al. (2011). "Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions." Pharmacogenomics J **11**(6): 400-411.
- Ahlin, G., J. Karlsson, et al. (2008). "Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1." J Med Chem **51**(19): 5932-5942.
- Al-Hajje, A., N. Calop, et al. (2009). "[Hemorrhagic complications of anti-vitamin K]." J Pharm Belg(1): 19-24.
- Alban, S. (2007). "Antikoagulanzen: Der steinige Weg zu Innovationen." Pharm Ztg **152**(23): 14-23.
- Albert, N. M., R. Buchsbaum, et al. (2007). "Randomized study of the effect of video education on heart failure healthcare utilization, symptoms, and self-care behaviors." Patient Educ Couns **69**(1-3): 129-139.
- Allgaier, C., K. Aktories, et al., Eds. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : mit ... 305 Tabellen. München, Elsevier, Urban & Fischer.
- Amphoux, A., V. Vialou, et al. (2006). "Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain." Neuropharmacology **50**(8): 941-952.
- Ansell, J., J. Hirsh, et al. (2008). "Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)." Chest **133**(6 Suppl): 160S-198S.
- Ansell, J., J. Hirsh, et al. (2004). "The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy." Chest **126**(3 Suppl): 204S-233S.
- AWMF. (2013). "S2-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und der Lungenembolie." from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/065-002_S2_Diagnostik_und_Therapie_der_Venenthrombose_und_der_Lungenembolie_06-2010_2.pdf.
- Bacq, A., L. Balasse, et al. (2012). "Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response." Mol Psychiatry **17**(9): 926-939.
- Bartlett, E. E. (1985). "Accomplishing more with less under PPS using patient education." Healthc Financ Manage **39**(7): 86-94.
- Bartlett, E. E. (1986). "How can patient education contribute to improved health care under prospective pricing?" Health Policy **6**(3): 283-294.
- Bartlett, E. E. (1989). "Patient education can lower costs, improve quality." Hospitals **63**(21): 88.
- Becquemont, L. (2008). "Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice." Eur J Clin Pharmacol **64**(10): 953-960.
- Bednarczyk, D., S. Ekins, et al. (2003). "Influence of molecular structure on substrate binding to the human organic cation transporter, hOCT1." Mol Pharmacol **63**(3): 489-498.
- Bent, S., H. Goldberg, et al. (2005). "Spontaneous bleeding associated with ginkgo biloba: a case report and systematic review of the literature: a case report and systematic review of the literature." J Gen Intern Med **20**(7): 657-661.

- BMG. (2007). "Aktionsplan zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit (AMTS) in Deutschland." from <http://www.akdae.de/AMTS/Aktionsplan/Aktionsplan-AMTS-2008-2009.pdf>.
- BMG. (2013). "Gesundheitsgefahr Depression." Retrieved April 29, 2013, from <http://www.bmg.bund.de/praevention/gesundheitsgefahren/depression.html>.
- Bone, K. M. (2008). "Potential interaction of Ginkgo biloba leaf with antiplatelet or anticoagulant drugs: what is the evidence?" *Mol Nutr Food Res* **52**(7): 764-771.
- Boyer, P., S. Montgomery, et al. (2008). "Efficacy, safety, and tolerability of fixed-dose desvenlafaxine 50 and 100 mg/day for major depressive disorder in a placebo-controlled trial." *Int Clin Psychopharmacol* **23**(5): 243-253.
- Braun, S., H. Völler, et al. (2009). "Aktualisierte Leitlinie „Gerinnungsselbstmanagement." *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* **134**(14): 695-700.
- Brock, T. P. and S. R. Smith (2007). "Using digital videos displayed on personal digital assistants (PDAs) to enhance patient education in clinical settings." *Int J Med Inform* **76**(11-12): 829-835.
- Burckhardt, G. and N. A. Wolff (2000). "Structure of renal organic anion and cation transporters." *Am J Physiol Renal Physiol* **278**(6): F853-866.
- Bymaster, F. P., L. J. Dreshfield-Ahmad, et al. (2001). "Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors." *Neuropsychopharmacology* **25**(6): 871-880.
- Camm, A. J., P. Kirchhof, et al. (2010). "Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)." *Eur Heart J* **31**(19): 2369-2429.
- Chenot, J. F. (2009). "[Cluster randomised trials: an important method in primary care research]." *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitsw* **103**(7): 475-480.
- Christensen, T. D., S. P. Johnsen, et al. (2007). "Self-management of oral anticoagulant therapy: a systematic review and meta-analysis." *Int J Cardiol* **118**(1): 54-61.
- Ciarimboli, G., D. Deuster, et al. (2010). "Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions." *Am J Pathol* **176**(3): 1169-1180.
- Clark, A. M., L. Hartling, et al. (2005). "Meta-analysis: secondary prevention programs for patients with coronary artery disease." *Ann Intern Med* **143**(9): 659-672.
- Coleman, K. A., V. Y. Xavier, et al. (2012). "An indirect comparison of the efficacy and safety of desvenlafaxine and venlafaxine using placebo as the common comparator." *CNS Spectr* **17**(3): 131-141.
- Collins, T. C., P. N. Krueger, et al. (2009). "Face-to-face interaction compared with video watching on use of physical activity in peripheral arterial disease: a pilot trial." *Angiology* **60**(1): 21-30.
- de Vries, J. X., R. Raedsch, et al. (1988). "Biliary excretion of phenprocoumon and metabolites." *Eur J Clin Pharmacol* **35**(4): 433-436.
- Decher, D. C., C. E. Beyer, et al. (2006). "Desvenlafaxine succinate: A new serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor." *J Pharmacol Exp Ther* **318**(2): 657-665.
- DiMatteo, M. R., P. J. Giordani, et al. (2002). "Patient adherence and medical treatment outcomes: a meta-analysis." *Med Care* **40**(9): 794-811.
- Egenberger, B., V. Gorboulev, et al. (2012). "A substrate binding hinge domain is critical for transport-related structural changes of organic cation transporter 1." *J Biol Chem* **287**(37): 31561-31573.

- Ellis, S. E., T. Speroff, et al. (2004). "Diabetes patient education: a meta-analysis and meta-regression." *Patient Educ Couns* **52**(1): 97-105.
- EMA. (2009). "Withdrawal Assessment Report for Ellefore." Retrieved January, 22, 2009, from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Application_withdrawal_assessment_report/2010/01/WC500064246.pdf.
- FDA. (2001). "Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation." 2001, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- Filipski, K. K., R. H. Mathijssen, et al. (2009). "Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity." *Clin Pharmacol Ther* **86**(4): 396-402.
- Franco, V., C. A. Polanczyk, et al. (2004). "Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols." *Am J Med* **116**(10): 651-656.
- Garcia-Alamino, J. M., A. M. Ward, et al. (2010). "Self-monitoring and self-management of oral anticoagulation." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD003839.
- Gasser, P. J., M. Orchinik, et al. (2009). "Distribution of organic cation transporter 3, a corticosterone-sensitive monoamine transporter, in the rat brain." *J Comp Neurol* **512**(4): 529-555.
- Giacomini, K. M., S. M. Huang, et al. (2010). "Membrane transporters in drug development." *Nat Rev Drug Discov* **9**(3): 215-236.
- Gibson, P. G., H. Powell, et al. (2003). "Self-management education and regular practitioner review for adults with asthma." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD001117.
- Gillies, C. L., K. R. Abrams, et al. (2007). "Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis." *BMJ* **334**(7588): 299.
- Goldinger, A. (2009). "Therapie mit Cumarinderivaten - Pharmakologie und Klinik von Phenprocoumon - Erster Teil ".
- Gorboulev, V., J. C. Ulzheimer, et al. (1997). "Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters." *DNA Cell Biol* **16**(7): 871-881.
- Gorboulev, V., C. Volk, et al. (1999). "Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate." *Mol Pharmacol* **56**(6): 1254-1261.
- Green, M. J. and N. Fost (1997). "Who should provide genetic education prior to gene testing? Computers and other methods for improving patient understanding." *Genet Test* **1**(2): 131-136.
- Grossmann, F. F. and R. Mahrer-Imhof (2008). "[Impact of patient education on self-care behaviour in patients with heart failure: a review of the literature]." *Pflege* **21**(2): 104-113.
- Guzman, J., R. Esmail, et al. (2001). "Multidisciplinary rehabilitation for chronic low back pain: systematic review." *BMJ* **322**(7301): 1511-1516.
- Hart, R. G., S. B. Tonarelli, et al. (2005). "Avoiding central nervous system bleeding during antithrombotic therapy: recent data and ideas." *Stroke* **36**(7): 1588-1593.
- Harter, M., C. Klesse, et al. (2010). "Evidenzbasierte Therapie der Depression; Die S3-Leitlinie unipolare Depression." *Der Nervenarzt* **81**(9): 1049.
- Heneghan, C., P. Alonso-Coello, et al. (2006). "Self-monitoring of oral anticoagulation: a systematic review and meta-analysis." *Lancet* **367**(9508): 404-411.
- Henn Cde, B., E. R. Rabelo, et al. (2008). "[Knowledge on chronic oral anticoagulation of patients followed up in a specialized outpatient clinic]." *Rev Gaucha Enferm* **29**(2): 207-213.

- Hirsh, J., J. Dalen, et al. (2001). "Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range." Chest **119**(1 Suppl): 8S-21S.
- Hua, T. D., S. V. Vormfelde, et al. (2011). "Practice nursed-based, individual and video-assisted patient education in oral anticoagulation--protocol of a cluster-randomized controlled trial." BMC Fam Pract **12**: 17.
- Hummers-Pradier, E., S. Hess, et al. (2003). "Determination of bleeding risk using genetic markers in patients taking phenprocoumon." Eur J Clin Pharmacol **59**(3): 213-219.
- Jaarsma, T., R. Halfens, et al. (1999). "Effects of education and support on self-care and resource utilization in patients with heart failure." Eur Heart J **20**(9): 673-682.
- Kagansky, N., H. Knobler, et al. (2004). "Safety of anticoagulation therapy in well-informed older patients." Arch Intern Med **164**(18): 2044-2050.
- Keller, T., B. Egenberger, et al. (2011). "The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization." J Biol Chem **286**(43): 37874-37886.
- Kerb, R., U. Brinkmann, et al. (2002). "Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences." Pharmacogenetics **12**(8): 591-595.
- Kido, Y., P. Matsson, et al. (2011). "Profiling of a prescription drug library for potential renal drug-drug interactions mediated by the organic cation transporter 2." J Med Chem **54**(13): 4548-4558.
- Kirchheiner, J., M. Ufer, et al. (2004). "Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers." Pharmacogenetics **14**(1): 19-26.
- Koepsell, H. (2004). "Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs." Trends Pharmacol Sci **25**(7): 375-381.
- Koepsell, H. (2011). "Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters." Biol Chem **392**(1-2): 95-101.
- Koepsell, H., K. Lips, et al. (2007). "Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications." Pharm Res **24**(7): 1227-1251.
- Koepsell, H., B. M. Schmitt, et al. (2003). "Organic cation transporters." Rev Physiol Biochem Pharmacol **150**: 36-90.
- Krouse, H. J. (2001). "Video modelling to educate patients." J Adv Nurs **33**(6): 748-757.
- Leabman, M. K., C. C. Huang, et al. (2002). "Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function." Pharmacogenetics **12**(5): 395-405.
- Lemmer, B. and G. Fülgraff, Eds. (2010). Pharmakotherapie : klinische Pharmakologie ; mit ... 192 Tab. ; [das Lehrbuch zum Querschnittsfach]. Springer-Lehrbuch. Heidelberg, Springer.
- Lind-Albrecht, G. (2006). "[Patient education in rheumatology: a way to better disease management using patients' empowerment]." Wien Med Wochenschr **156**(21-22): 583-586.
- Madison, N. J. (2007). "Wyeth Receives Approvable Letter From FDA For Pristiq For The Treatment Of Major Depressive Disorder." Retrieved January, 23, 2007, from http://www.biospace.com/news_story.aspx?StoryID=43424&full=1.
- Manschwet, H. (2003). "Qualitätsstandards und Zertifizierungen der Patientenschulung in der Rheumatologie Quality standards and certification of patient education in rheumatology." Zeitschrift für Rheumatologie **62**(2): ii21-ii23.
- Mathers, C., D. M. Fat, et al. (2008). The global burden of disease: 2004 update, World Health Organization.

- Michie, S., C. Abraham, et al. (2009). "Effective techniques in healthy eating and physical activity interventions: a meta-regression." Health Psychol **28**(6): 690-701.
- Mutschler, E., Ed. (2006). Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt : Basiswissen Pharmakologie, Toxikologie ; mit 64 Tabellen. Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges.
- Mutschler, E. (2013). Mutschler Arzneimittelwirkungen : Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; mit ... 257 Tab. Stuttgart, Wiss. Verlagsges.
- Nichols, A. I., K. Focht, et al. (2011). "Pharmacokinetics of venlafaxine extended release 75 mg and desvenlafaxine 50 mg in healthy CYP2D6 extensive and poor metabolizers: a randomized, open-label, two-period, parallel-group, crossover study." Clin Drug Investig **31**(3): 155-167.
- Nies, A. T., U. Hofmann, et al. (2011). "Proton pump inhibitors inhibit metformin uptake by organic cation transporters (OCTs)." PLoS One **6**(7): e22163.
- Nies, A. T., H. Koepsell, et al. (2011). "Organic cation transporters (OCTs, MATes), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy." Handb Exp Pharmacol(201): 105-167.
- Nies, A. T., H. Koepsell, et al. (2009). "Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver." Hepatology **50**(4): 1227-1240.
- Norris, S. L., J. Lau, et al. (2002). "Self-management education for adults with type 2 diabetes: a meta-analysis of the effect on glycemic control." Diabetes Care **25**(7): 1159-1171.
- Osterspey, A. and V. Zylka-Menhorn (2011). "Neue Orale Antikoagulantien: Sehr potent, aber kostspielig." Dtsch Arztebl **108**(47).
- Pae, C. U. (2009). "Desvenlafaxine: a new antidepressant or just another one?" Expert Opin Pharmacother **10**(5): 875-887.
- Pfizer. (2013). "Highlights of Prescribing Information." 2013, from <http://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=497>.
- Popp, C., V. Gorboulev, et al. (2005). "Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease." Mol Pharmacol **67**(5): 1600-1611.
- Rehse, B. and R. Pukrop (2003). "Effects of psychosocial interventions on quality of life in adult cancer patients: meta analysis of 37 published controlled outcome studies." Patient Educ Couns **50**(2): 179-186.
- Riemsma, R. P., E. Taal, et al. (2004). "Systematic review of rheumatoid arthritis patient education." Arthritis Rheum **51**(6): 1045-1059.
- Rietbrock, N., Ed. (2001). Klinische Pharmakologie : mit ... 219 Tabellen. Darmstadt, Steinkopff.
- Rosendaal, F. R., S. C. Cannegieter, et al. (1993). "A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy." Thromb Haemost **69**(3): 236-239.
- Ryan, F., S. Byrne, et al. (2008). "Managing oral anticoagulation therapy: improving clinical outcomes. A review." J Clin Pharm Ther **33**(6): 581-590.
- Ryan, R. E., M. J. Pictor, et al. (2008). "Audio-visual presentation of information for informed consent for participation in clinical trials." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003717.
- Saadatmand, A. R. (2012). OCT1-mediated cellular drug uptake and interactions between drug transport and drug metabolism.

- Sata, R., H. Ohtani, et al. (2005). "Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta." J Pharmacol Exp Ther **315**(2): 888-895.
- Scalley, R. D., E. Kearney, et al. (1979). "Interdisciplinary inpatient warfarin education program." Am J Hosp Pharm **36**(2): 219-220.
- Schmitt, B. M. and H. Koepsell (2005). "Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2." J Biol Chem **280**(26): 24481-24490.
- Schurgers, L. J., M. J. Shearer, et al. (2004). "Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects." Blood **104**(9): 2682-2689.
- Schwabe, U. and D. Paffrath (2009). Arzneiverordnungs-Report 2009 : Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Schwabe, U. and D. Paffrath (2012). Arzneiverordnungs-Report 2012 : Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Schwartz, D., B. Fischhoff, et al. (2013). "The Hawthorne effect and energy awareness." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Sconce, E., T. Khan, et al. (2005). "Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K compared to patients with stable control of anticoagulation." Thromb Haemost **93**(5): 872-875.
- Sebregts, E. H., P. R. Falger, et al. (2000). "Risk factor modification through nonpharmacological interventions in patients with coronary heart disease." J Psychosom Res **48**(4-5): 425-441.
- Shu, Y., M. K. Leabman, et al. (2003). "Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5902-5907.
- Shu, Y., S. A. Sheardown, et al. (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." J Clin Invest **117**(5): 1422-1431.
- Smith, S. R., J. C. Rublein, et al. (2003). "A medication self-management program to improve adherence to HIV therapy regimens." Patient Educ Couns **50**(2): 187-199.
- Strobl, V., R. Kuffner, et al. (2009). "[Patient education: quality criteria in its implementation]." Rehabilitation (Stuttg) **48**(3): 166-173.
- Ströbl, V., R. Küffner, et al. (2007). "Hinweise zur Erstellung eines Schulungsmanuals." Zentrum Patientenschulung.
- Takeda, M., S. Khamdang, et al. (2002). "Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 918-924.
- Torn, M., W. L. Bollen, et al. (2005). "Risks of oral anticoagulant therapy with increasing age." Arch Intern Med **165**(13): 1527-1532.
- Tzvetkov, M. V., A. R. Saadatmand, et al. (2012). "Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron." Pharmacogenomics J **12**(1): 22-29.
- Tzvetkov, M. V., A. R. Saadatmand, et al. (2011). "Genetically polymorphic OCT1: another piece in the puzzle of the variable pharmacokinetics and pharmacodynamics of the opioidergic drug tramadol." Clin Pharmacol Ther **90**(1): 143-150.
- Tzvetkov, M. V., S. V. Vormfelde, et al. (2009). "The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin." Clin Pharmacol Ther **86**(3): 299-306.
- Urban, T. J., C. Yang, et al. (2007). "Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (SLC22A4)." Pharmacogenet Genomics **17**(9): 773-782.

- Van der Meer, J., H. C. Hemker, et al. (1968). "Pharmacological aspects of vitamin K1. A clinical and experimental study in man." Thromb Diath Haemorrh Suppl **29**: 1-96.
- Visser, A., A. Deccache, et al. (2001). "Patient education in Europe: united differences." Patient Educ Couns **44**(1): 1-5.
- Volk, C., V. Gorboulev, et al. (2003). "Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2." Mol Pharmacol **64**(5): 1037-1047.
- Wells, P. S., A. Brown, et al. (2007). "Safety and effectiveness of point-of-care monitoring devices in patients on oral anticoagulant therapy: a meta-analysis." Open Med **1**(3): e131-146.
- Wirth, H., R. Hürlimann, et al. (2006). "NSAR und COX-2-Hemmer: die häufigsten unerwünschten Wirkungen." Schweiz Med Forum **6**: 284-289.
- Wofford, J. L., M. D. Wells, et al. (2008). "Best strategies for patient education about anticoagulation with warfarin: a systematic review." BMC Health Serv Res **8**: 40.
- York, M., A. Agarwal, et al. (2003). "Physicians' attitudes and the use of oral anticoagulants: surveying the present and envisioning future." J Thromb Thrombolysis **16**(1-2): 33-37.
- Zanger, U. M., S. Raimundo, et al. (2004). "Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(1): 23-37.
- Zhang, L., M. J. Dresser, et al. (1997). "Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter." Mol Pharmacol **51**(6): 913-921.
- Zhang, L., M. E. Schaner, et al. (1998). "Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa)." J Pharmacol Exp Ther **286**(1): 354-361.
- Zhang, Q., C. Bal-dit-Sollier, et al. (2011). "Interaction between acetaminophen and warfarin in adults receiving long-term oral anticoagulants: a randomized controlled trial." Eur J Clin Pharmacol **67**(3): 309-314.
- Zolk, O., T. F. Solbach, et al. (2009). "Functional characterization of the human organic cation transporter 2 variant p.270Ala>Ser." Drug Metab Dispos **37**(6): 1312-1318.
- Zolk, O., T. F. Solbach, et al. (2009). "Structural determinants of inhibitor interaction with the human organic cation transporter OCT2 (SLC22A2)." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **379**(4): 337-348.

CURRICULUM VITAE

Name: Manar Abu Abed
Geburtsdatum: 29.06.1986
Geburtsort: Marburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1992-1998	Grundschule am Vierrutenberg, Berlin
1998-2005	Romain-Rolland-Gymnasium, Berlin
26.05.2005	<i>Allgemeine Hochschulreife</i>

Studium

2005-2010	Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
11.09.2008	<i>1. Staatsexamen</i>
15.04.2010	<i>2. Staatsexamen</i>
30.10.2013	<i>3. Staatsexamen</i>

Promotionsstudium

2010-2013	Doktorandin am Uniklinikum Göttingen in der Abteilung Klinische Pharmakologie
-----------	--

Berufstätigkeit

1.04.2013-30.09.2013	Pharmazeutin im Praktikum in der Sanitas Apotheke in Berlin
----------------------	--